BAND XIV NEUE FOLGE LIEFERUNG 2

BAND VIII

MIKROCHEMIE

Internationales Archiv für deren Gesamtgebiet

Redigiert von

W. BÖTTGER, Leipzig / **F. EMICH**, Graz / **H. EPPINGER**, Wien / **F. FEIGL**, Wien
H. LIEB, Graz / **H. MOLISCH**, Wien / **F. PREGL** †, Graz / **R. WASICKY**, Wien.

Unter Mitwirkung von:

E. Abderhalden - Halle, **H. V. Arny** - New York, **Y. Asahina** - Tokio, **G. Barger** - Edinburgh, **A. Benedetti-Pichler** - New York, **R. Berg** - Königsberg, **G. Bertrand** - Paris, **W. Biltz** - Hannover, **J. C. Bock** - Milwaukee, **E. M. Chamot** - Ithaca, **O. Dafert** - Wien, **G. Denigès** - Bordeaux, **J. Donau** - Graz, **J. Dubský** - Brünn, **R. Eder** - Zürich, **S. Edlbacher** - Basel, **R. Ehrenberg** - Göttingen, **H. v. Euler** - Stockholm, **F. K. Faber** - Wien, **B. Flaschenträger** - Zürich, **E. Freund** - Wien, **A. Friedrich** - Wien, **F. Fuhrmann** - Graz, **O. Fürth** - Wien, **W. Geilmann** - Hannover, **W. C. de Graaf** - Utrecht, **H. Gravestein** - Delft, **H. G. Greenish** - London, **R. Grengg** - Wien, **F. L. Hahn** - Frankfurt a. M., **M. Haitinger** - Wien, **F. Haurowitz** - Prag, **K. Heller** - Prag, **J. Heyrovský** - Prag, **L. van Itallie** - Leiden, **H. Jansch** - Wien, **S. Kakiuchi** - Tokio, **J. Kendall** - Edinburgh, **J. Kisser** - Wien, **G. Klein** - Heidelberg, **H. Kleinmann** - Berlin, **P. D. C. Kley** - Delft, **F. Knoop** - Tübingen, **L. Kofler** - Innsbruck, **J. M. Kolthoff** - Minneapolis, **G. Lunde** - Stavanger, **K. L. Maljaroff** - Moskau, **A. Martini** - Rosario, **A. Mayrhofer** - Wien, **L. B. Mendel** - New Haven, **A. Miolati** - Padova, **J. M. Nelson** - New York, **J. B. Niederl** - New York, **W. Nonnenbruch** - Prag, **F. Paneth** - Königsberg, **J. K. Parnas** - Lemberg, **V. Patzelt** - Wien, **W. Pauli** - Wien, **E. Philippi** - Innsbruck, **L. Pincussen** - Berlin, **D. Prianischnikow** - Moskau, **H. Pfibram** - Prag, **K. Rast** - Leverkusen, **P. Rona** - Berlin, **L. Rosenthaler** - Bern, **O. Ruff** - Breslau, **H. Schmalfuß** - Hamburg, **E. Schmitz** - Breslau, **N. Schoorl** - Utrecht, **F. Schulz** - Jena, **C. Schwarz** - Wien, **Y. Shibata** - Tokio, **H. Siedentopf** - Jena, **E. v. Skramlik** - Jena, **D. D. van Slyke** - New York, **A. Soltys** - Graz, **E. Starkenstein** - Prag, **Z. Stary** - Prag, **W. Stepp** - Breslau, **A. Stock** - Karlsruhe, **J. Stoklasa** - Prag, **K. Thomas** - Leipzig, **J. Tillmans** - Frankfurt a. M., **A. Tschermak-Seysenegg** - Prag, **A. Tschirch** - Bern, **C. Urbach** - Prag, **A. Viehoever** - Philadelphia, **C. Weygand** - Leipzig, **H. Winterstein** - Breslau, **O. Wintersteiner** - New York, **F. Zaribnicky** - Wien, **R. Zeynek** - Prag.

Inhaltsverzeichnis auf Seite II

Mikrochemie erscheint in zwangloser Folge — in Lieferungen von verschiedenem Umfange.

EMIL HAIM & CO.
WIEN UND LEIPZIG
1934

Wir empfehlen beiliegende Prospekte besonderer Beachtung

PAUL HAACK

Wien, IX./3, Garelligasse Nr. 4

Gegründet 1893

Telephon Nr. A-22-0-25 Postspark.-Konto 48.473

Alle Apparate für die quantitative organische Mikroanalyse

nach Prof. Pregl

Alle mikrochemischen Apparate und Behelfe

nach Prof. Emich

Behelfe zur Tüpfelanalyse

nach Doz. Feigl

Spezial-Reagenzien für analytische Chemie

Chemische und bakteriologische Apparate

Eigene Werkstätte für Glasbläserei, Ätzerei, Schleiferei und Laboratoriums-Utensilien

Unsere Vertretung in U. S. A.:

MICROCHEMICAL SERVICE

30 Van Zandt Ave., Douglaston, New York

BEITRÄGE ZUR JODOMETRIE.

Von

FRIEDRICH RAPPAPORT.

1. MITTEILUNG: MIKROBESTIMMUNG DES EISENS.

Von

F. RAPPAPORT und E. HOHENBERG.

Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der Universität und dem S.-Canning-Childs-Spital und Forschungsinstitut in Wien.

(Eingelangt am 12. Juni 1933.)

Die gebräuchlichsten Mikro-Eisenbestimmungen zerfallen in kolorimetrische und maßanalytische Methoden. Die gebräuchlichsten kolorimetrischen Verfahren, welche auf der Farbreaktion des Ferriions mit Rhodankali, Ferrocyankali usw.[1] (siehe STARY: Sammelreferat der Mikrochemie) beruhen, schließen eine ganze Reihe von Fehlerquellen in sich, die ihren Grund in Verunreinigungen und mangelhafter Haltbarkeit der Reagenzien, sowie Abhängigkeit der Farbintensität von der Acidität, Phosphorsäuregehalt und Belichtung haben. Erst neuerdings haben F. FEIGL, P. KRUMHOLZ und H. HAMBURG[2] eine Methode mit α-α'-Dipyridyl angegeben, die, auf einer Farbreaktion von Fe(2)salzen beruhend, gegenüber den älteren Verfahren wesentliche Vorteile aufweist. ROBERT HILL[3] und WOLFGANG LINTZEL[4] haben diese Methode für physiologische Zwecke verwendet.

Unter den zahlreichen maßanalytischen Methoden kann man grundsätzlich zwei Verfahren unterscheiden: 1. Oxydation des

[1] Vgl. Z. STARY, Mikrochemie, **XII**, 355 (1933).

[2] Ztschr. analyt. Chem., **86**, 7 (1931).

[3] ROBERT HILL, Proc. roy. Soc., Lond., B. **107**, 205 (1930).

[4] W. LINTZEL, Ztschr. f. exp. Med., B. **86**, 269 (1933).

Ferroeisens; 2. Reduktion des Ferrieisens; in beiden Fällen beruhen die Methoden auf der Messung der notwendigen Mengen des Oxydationsmittels, bezw. Reduktionsmittels.

ad 1. Ferroeisen läßt sich bequem und exakt mit Kaliumpermanganat bestimmen, doch liegt die wichtigste Fehlerquelle in der Schwierigkeit der vollständigen Reduktion des Ferrieisens, die zur Vorbereitung für die Permanganattitration notwendig ist. Außerdem ist die genaue Erkennung des Permanganatumschlages bei kleinen Mengen ziemlich schwierig.

ad 2. Zu den gebräuchlichsten Reduktionsmethoden gehört die Titanmethode. Das dreiwertige Eisen wird mit Titan(III)salzen in zweiwertiges überführt, doch kommt es leicht zur Autooxydation der Titan(III)salze, wodurch ein Arbeiten in Kohlensäureatmosphäre erforderlich wird. Auch hier ist der Endpunkt der Titration schwer genau zu erkennen, obwohl zahlreiche Modifikationen angegeben wurden[5].

Die bisher üblichen jodometrischen Methoden beruhen auf der Reduktion des Ferriions durch KJ unter Freimachen von Jod. Diese Reaktion ist eine Gleichgewichtsreaktion und verläuft in der Kälte trotz großen KJ-Überschusses nicht quantitativ nach der Gleichung

$$2\,FeCl_3 + 2\,KJ = 2\,KCl + 2\,FeCl_2 + J_2.$$

Es ist daher ein Arbeiten mit gestellten Vergleichslösungen notwendig, wobei eine Berechnung wie bei den kolorimetrischen Methoden in Betracht kommt, was die Methode ungenau macht, weil man mit mehreren Faktoren (Volumen, Acidität usw.) zu rechnen hat.

Im folgenden wird eine Methode angegeben, die zwar auch auf der Reduktion des Ferrieisens durch KJ beruht, doch wird die Reduktion in der Hitze durchgeführt, wodurch die Reaktion vollständig im Sinne der Gleichung verläuft, und zwar durch Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit und durch Störung des Gleichgewichtes infolge Beseitigung des einen Reaktionsproduktes (J). Außerdem wird bei unserer Methode das frei gewordene und überdestillierte Jod in Jodat überführt, wodurch eine Versechsfachung des Berechnungsfaktors erfolgt.

[5] Vgl. Stary, l. c.

Um die Reaktion quantitativ durchzuführen, mußten einerseits das gebildete Ferrosalz vor Rückoxydation geschützt, anderseits ein KJ verwendet werden, das trotz der Siedehitze und stark sauren Reaktion beständig ist und kein Jod abspaltet. Wäre das von uns verwendete Jodkali unbeständig, so könnte man auch nicht mit den bei Mikromethoden üblichen Blindwerten arbeiten, weil die Selbstzersetzung des KJ von vielen Faktoren (Volumen, Acidität, KJ-Konzentration) abhängt, so daß wechselnde Fehler entstehen würden.

Die Reaktion führten wir in einem von uns modifizierten PARNAS-WAGNER-Apparate durch, der es gestattet, in Wasserdampfatmosphäre zu arbeiten (siehe Abb. 1). Der Wasserdampf

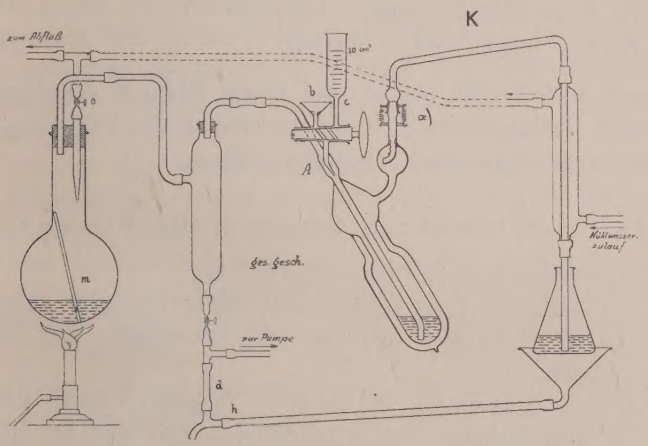


Abb. 1[5a].

a stellt einen Glasschliff dar, der aber nur dann angebracht wird, wenn der Apparat transportabel gebaut werden soll. Gedichtet wird der Schliff mit sirupöser Phosphorsäure.

treibt die ganze Luft aus dem Apparat aus und reißt das frei gewordene Jod in die Vorlage mit. Um ein KJ zu erhalten, das den oben verlangten Anforderungen entspricht, haben wir die Fähigkeit der Komplexbildung zwischen KJ und Cadmiumsalzen ausgenützt und das KJ in einer überschüssigen Lösung von Cadmiumsulfat verwendet. Diese Komplexverbindung (wahrscheinlich

[5a] Der fertige Apparat ist bei der Firma P. Haack, Wien, IX., zu beziehen.

$K_2[CdJ_4]$ ist hitzebeständig, doch läßt sie die Reaktionsfähigkeit des KJ unangetastet.

Die Bestimmung erfolgt in zwei Phasen: 1. Austreibung des Jods, 2. Oxydation des Jods zu Jodat.

Die Bestimmung des Jods führen wir durch Oxydation desselben mit Brom zu Jodat durch; die Entfernung des überschüssigen Broms erfolgt nach der sehr eleganten Methode von VIEBÖCK[6] mit Ameisensäure. Es finden demnach folgende Umsetzungen statt:

1. $2\,FeCl_3 + 2\,KJ = 2\,FeCl_2 + 2\,KCl + J_2$,
2. $J_2 + Br_2 = 2\,JBr$,
3. $JBr + 2\,Br_2 + H_2O = HJO_3 + 5\,HBr$,
4. $Br_2 + HCOOH = 2\,HBr + CO_2$,
5. $HJO_3 + 5\,HJ = 3\,J_2 + 3\,H_2O$.

Aus 1 und 3 geht hervor, daß einem Eisen 6 Jodatome entsprechen. Daraus ergibt sich die Berechnung des Faktors:

1 ccm n/200-Thiosulfat = 0,0465 mg Eisen.

Zur Bestimmung erforderliche Reagenzien:

1. Eisenfreie konz. Salpetersäure (1,4).
2. 11 ccm konz. Schwefelsäure auf 100 ccm Wasser (20%).
3. 15 mg Methylrot, 10 ccm 1/n-Natronlauge auf 100 ccm Wasser.
4. 10 γ KJ, gelöst in 20 ccm einer 20%igen $CdSO_4$; die Cadmiumsulfatlösung ist unbeschränkte Zeit haltbar, doch das Gemenge muß vor Gebrauch frisch bereitet werden.
5. 20 Teile einer 1/n-Natronlauge + 15 Teile einer 2%igen Natriumsulfitlösung. Kühl aufbewahren!
6. Natriumacetat, 15%.
7. Bromeisessig: 3 ccm Brom auf 100 ccm Eisessig.
8. Konz. Ameisensäure.
9. KJ, fest.
10. 0,005 n-Thiosulfat.

Arbeitsgang: Die zu untersuchende Probe wird durch den Trichter b in den umseitig abgebildeten Apparat quantitativ

[6] F. VIEBÖCK und C. BRECHER, Pharmaz. Monatsh., **10**, 192 (1929).

überführt und 2 ccm der Schwefelsäure (2) hinzugefügt. Der Hahn wird geschlossen und Wasserdampf aus dem Kolben m durch den Apparat geschickt, bis alle Luft entwichen ist, was man daran erkennt, daß das Rohr bei k heiß geworden ist und aus der Vorlage keine Luftblasen mehr entweichen. Durch entsprechende Hahndrehung werden aus dem Trichter c 2 ccm der Kalium-Cadmium-Jodid-Lösung (4) zugetropft. Vorgelegt wurden in einem Kölbchen 2 ccm der Lösung (5). Ist die Probe eisenhaltig, so erkennt man die Jodabscheidung an der Gelbfärbung der im Destillationskolben befindlichen Flüssigkeit, die im Verlaufe der Destillation wieder verschwindet, da das Jod durch den Wasserdampf in die Vorlage mitgerissen wird. Man destilliert 2 Minuten, wobei das Rohr K in die Vorlage eintaucht. Dann senkt man das Vorlagekölbchen und läßt weitere 2 Minuten destillieren. Das in der Vorlage abgefangene Jod wird nun in Jodat überführt: Man gibt in die Vorlage 5 Tropfen des Indikators (3) und läßt tropfenweise Schwefelsäure (2) bis zur schwach sauren Reaktion einfließen. Jetzt versetzt man mit 3 ccm Natriumacetat (6) und tropft aus einer Tropfflasche so lange Bromeisessig (7) zu, bis die Lösung dauernd durch Brom gelbbraun gefärbt bleibt. Nach 2 Minuten setzt man tropfenweise Ameisensäure bis zum vollständigen Verschwinden der Bromfarbe zu. Die etwa im Kölbchen vorhandenen Bromdämpfe werden an der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und 2 ccm der Schwefelsäure (2) hinzugefügt. Man titriert nach Zusatz einiger Körnchen KJ und etwas Stärke mit 0,005 n-Thiosulfat bis farblos. Nach jeder Bestimmung muß der Apparat mit redestilliertem Wasser nachgewaschen werden, wobei man das Wasser mit einer Wasserstrahlpumpe von b, c und K aus durchsaugt, indem man den Schlauch bei d mit der Hand verschließt.

Um die Methode auf ihre Brauchbarkeit zu prüfen, arbeiteten wir zunächst mit eingewogenen Ferrichlorid-Lösungen. Tabelle I zeigt die gute Übereinstimmung der theoretischen mit den praktisch gefundenen Werten.

Wir prüften auch, inwieweit etwa vorhandene Phosphorsäure den Reaktionsverlauf stört, indem wir zur untersuchten Eisenprobe 2 ccm molarer Phosphorsäure, also einen sehr großen Überschuß, zusetzten. Wir konnten, wie aus Tabelle II hervorgeht, keine Beeinträchtigung der Reaktion feststellen.

Tabelle I.

Ferrichlorid.

eingewogen	gefunden
0,200 mg Fe	0,221 mg Fe
0,400 „ „	0,3974 „ „
0,800 „ „	0,8004 „ „
1,600 „ „	1,6453 „ „
0,040 „ „	0,0396 „ „
0,018 „ „	0,01886 „ „

Tabelle II.

Ohne Phosphorsäure	Mit Phosphorsäure
0,2001 mg Fe	0,2008 mg Fe
0,0396 „ „	0,0398 „ „

Liegt das Eisen in Ferroform vor, so muß es zunächst in die Ferriform überführt werden. Im Hinblick auf eine allgemeine Anwendbarkeit der Methode mußte von dem verwendeten Oxydationsmittel gefordert werden, daß ein Überschuß desselben unschädlich und quantitativ entfernbar sei und andere Metalle der Eisengruppe, wie Chrom, Mangan, nicht in ihre höheren Oxydationsstufen überführt würden. Als geeignetes Oxydationsmittel erwies sich Salpetersäure, deren Oxydationswirkung sich nach Überführung des Eisens in die Ferriform jederzeit mit Harnstoff ausschalten läßt.

Als Versuchslösung wählten wir Ferroammonsulfat, das wir in folgender Weise oxydierten: In einer Eprouvette wurden 2 ccm der Untersuchungslösung, verdünnt mit etwa 3 ccm Wasser, mit 0,5 ccm konz. Salpetersäure (1) versetzt und für 5 Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt. Hierauf wurden 2 ccm 40%iger Harnstofflösung hinzugefügt, und zwar in der Weise, daß man die Wand der Eprouvette abspült, um an ihr etwa haftende Spuren von Salpetersäure zu entfernen. Schließlich wurde nochmals 2 Minuten gekocht. Dieses Verfahren gestattet selbstverständlich, mehrere Proben gleichzeitig zu behandeln. Nach dem Erkalten wurden die Proben in unseren Destillationsapparat überführt und

genau wie oben beschrieben behandelt. Bei eisenfreien Reagenzien konnte in Blindversuchen bei gleicher Behandlung keine Jodabscheidung nachgewiesen werden.

Daß eine Salpetersäure, die mit Harnstoff versetzt ist, nicht imstande ist, Ferro- in Ferrisalze überzuführen, konnten wir auf folgende Weise feststellen:

0,5 ccm Salpetersäure wurde mit 2 ccm 40%igem Harnstoff wie oben gekocht und in diese Lösung eine bestimmte Menge von Ferroammonsulfat hinzugegeben. Bei der weiteren Behandlung dieser Probe erfolgte keine Jodabscheidung, womit bewiesen war, daß die Salpetersäure vollständig unwirksam geworden ist.

Wir untersuchten dann alle Metalle der dritten Gruppe auf Jodabscheidungsvermögen nach Behandlung mit Salpetersäure, indem wir einerseits entsprechende Lösungen allein, anderseits unter Zusatz zu gemessenen Eisenmengen behandelten. Die eisenfreien Proben gaben stets Nullwerte und die zugesetzten Eisenmengen konnten immer quantitativ wiedergefunden werden. Nur bei Mangan kam es manchmal zur Bildung von Braunstein, doch kann dies leicht durch Hinzufügen von etwas Phosphorsäure vermieden werden.

Wir mußten auch untersuchen, inwiefern freie verdünnte Salzsäure die Oxydation des Ferroions in das Ferriion mittels Salpetersäure zu stören imstande ist, da doch im Verlaufe des Analysenganges die Metalle der zweiten Gruppe von denen der dritten Gruppe mit H_2S in salzsaurer Lösung abgetrennt werden. Wir setzten 2 ccm 10% HCl und 0,5 ccm konz. Salpetersäure zu unseren Metallproben und behandelten wie oben mit Harnstoff, worauf bei der Destillation eine enorme Jodentwicklung stattfand; Liegen also salzsaure Ferroverbindungen vor, so muß man die freie HCl zunächst mit NaOH neutralisieren, und zwar bis zur Bildung eines feinen Niederschlages, der wieder mit einigen Tropfen Schwefelsäure aufgelöst wird, und nach Behandlung mit Salpetersäure wie oben verfahren.

Bestimmung des Eisens in organischen Substanzen.

Liegt das Eisen in organischen Substanzen, wie Blut, Gewebe, oder in komplexen organischen Verbindungen vor, so muß die organische Substanz erst zerstört werden, ehe sich das Eisen be-

stimmen läßt. Dazu wählten wir eine feuchte Veraschung, die für Serien- und Reihenuntersuchungen viel besser geeignet ist als die Veraschung im Tiegel oder ein Kaliumpyrosulfataufschluß. Für unsere Zwecke erwies sich konz. Schwefelsäure bei Gegenwart von H_2O_2 als besonders geeignet. Die Veraschung, die wir im Mikro-KJELDAHL-Kolben vornahmen, ging sehr leicht vor sich und der Endpunkt des Prozesses war leicht an dem Farbloswerden des Kolbeninhaltes zu erkennen. Da aber auch Spuren von H_2O_2 die Bestimmung durch Freimachen von Jod aus Jodkali empfindlich stören könnten, war es notwendig, für die quantitative Zerstörung des H_2O_2 zu sorgen sowie auch dieselbe zu erkennen. Wir wählten zu diesem Zwecke Ti(IV)salz, das als empfindliches Reagens auf H_2O_2 bekannt ist, da es mit demselben die orangerote lösliche Peroxodisulfato-Titansäure[7] bildet, die in der Siedehitze noch leichter zersetzlich ist als H_2O_2 selbst. Außerdem hat das Titan den Vorteil, daß es, wie wir a. a. O. zeigen konnten[8], einen ausgezeichneten Katalysator für die Veraschung organischer Substanzen mit konz. Schwefelsäure darstellt. Titan ist also nicht nur ein wertvoller anorganischer Indikator für das Vorhandensein von H_2O_2, sondern es katalysiert auch die Zersetzung von H_2O_2 und beschleunigt die Veraschung.

Wir versuchten anfangs, die Veraschung mit gestellten Eisenlösungen durchzuführen; es stellte sich aber heraus, daß die erhaltenen Werte, abhängig von der Titankonzentration, um 10 bis 20% niedriger ausfielen. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, daß sich in der Siedehitze eine komplexe Eisentitanverbindung bildet, die der Reduktion durch KJ Widerstand leistet. Die Bildung einer derartigen Verbindung geht anscheinend nur in wasserfreiem Zustand vor sich, denn wenn wir die Titan- und Eisenlösungen ohne vorherige Veraschung gemeinsam im Destillationsapparat verarbeiteten, wurden keine Jodverluste festgestellt. Ebenso unterblieben die Abweichungen, wenn wir Eisen im Blut bestimmten; Proben, die wir mit und ohne Titanzusatz anstellten, ergaben vollkommen identische Werte. Wir vermuteten, daß Ammonsulfat, das als Endprodukt jeder Veraschung von Amino-

[7] R. SCHWARZ, Ztschr. anorgan. Chem., **210**, 303 (1933).

[8] Gelegentlich unserer Untersuchungen über die Stickstoffbestimmung im Blute; F. RAPPAPORT, Mikrochemie, **XIV**, 49 (1933).

substanzen entsteht, die Bildung des Titaneisenkomplexes verhindert. Diese Annahme erwies sich tatsächlich bei entsprechend angestellten Versuchen als richtig.

Folgende Zusammensetzung der Veraschungsflüssigkeit fanden wir nach zahlreichen Versuchen als besonders geeignet: 33 ccm Schwefelsäure, 2 g Ammonsulfat und 0,05 g Titanhydroxyd werden mit H_2O auf 100 ccm gebracht.

Die Brauchbarkeit unserer Methode erhärteten wir an Hand folgender Versuche:

Gemessene Mengen gestellter Ferri- und Ferrosalzlösungen werden in einem Mikro-KJELDAHL-Kolben mit 2 ccm der Veraschungsschwefelsäure versetzt, 1 ccm H_2O_2 (Merck) hinzugefügt und bis zum Verschwinden der orangeroten Farbe verascht. Dann werden die Proben genau wie oben beschrieben behandelt.

Tabelle III.

Ferrichlorid		Ferroammonsulfat	
eingewogen	gefunden	eingewogen	gefunden
0,800 mg Fe	0,8002 mg Fe	0,1362 mg Fe	0,1370 mg Fe
0,400 „ „	0,3986 „ „	0,0681 „ „	0,0694 „ „

Da sich diese Bestimmungen als richtig erwiesen, haben wir die Methode zur Erfassung des Blut- und Gewebe-Eisens ausgearbeitet.

Arbeitsgang: Mit einer genauen Pipette werden 0,1 bis 0,2 ccm Blut aus der Fingerbeere (oder Kaliumoxalatblut) entnommen. Die Pipette wird von außen gut abgewischt und der Inhalt in einen Mikro-KJELDAHL-Kolben, in dem sich einige Glasperlen zur Verhinderung des Siedeverzuges befinden, hineinpipettiert und mit einigen Tropfen redestillierten Wassers nachgewaschen. Nach Zufügen von 2 ccm der Veraschungs-Schwefelsäure und 0,1 ccm Perhydrol wird das Kölbchen erst vorsichtig und langsam, dann stärker, bis zum Verschwinden der weißen Schwefelsäuredämpfe erhitzt. Wenn dies der Fall ist, wird die Veraschung unterbrochen, die Probe erkalten gelassen, 1 ccm Perhydrol hinzugefügt und bis zum Verschwinden der orangeroten Farbe erhitzt. Nach dem Erkalten wird der Inhalt mit etwas redestilliertem Wasser verdünnt. Sollte sich die Probe durch etwa am

Kolbenhalse haften gebliebene Spuren von H_2O_2 nochmals orangerot färben, so muß der Veraschungsprozeß wiederholt werden. Dann wird die Probe in den Destillationsapparat gebracht und, wie früher beschrieben, weiterbehandelt. Es wurden auch Organe, wie Leber, Milz, Gehirn usw., untersucht. Bei Substanzen, die sich besonders schwer veraschen lassen, muß man mit Salpetersäure vorbehandeln. Die zu untersuchende Substanz wird mit 1 ccm Salpetersäure und 2 ccm der Veraschungsflüssigkeit gekocht, die Probe erkalten gelassen, 1 ccm Perhydrol hinzugefügt, und weiter, wie bei Blut angegeben, verascht. Der Zusatz von Harnstoff erübrigt sich in diesem Falle, weil Ammonsulfat etwa in Spuren vorhandene Nitrosoverbindungen unter Bildung von Stickstoff beseitigt.

Über die Anwendung der obenbeschriebenen Methode zur Mikrobestimmung anderer anorganischer und organischer Körper (J, H_3PO_4, Br, Ca, Oxalsäure, Ammoniak usw.) sind Versuche im Gange, über deren Ergebnisse wir berichten werden.

Sur une micro-méthode de dosage de l'acide urique dans l'urine.

Par

P. Wenger, Ch. Cimerman et A. Maulbetsch.

Laboratoire de Chimie Analytique de l'Université de Genève.

(Eingelangt am 21. Juli 1933.)

De nombreuses méthodes volumétriques, gravimétriques, colorimétriques, etc. ont été proposées pour le dosage de l'acide urique. Pour l'urine, ce sont les méthodes volumétriques qui sont le plus employées, notamment la méthode de Ronchèse, d'après laquelle on précipite l'acide urique de l'urine sous forme d'urate d'ammonium; l'acide urique ainsi isolé est oxydé par une solution décinormale d'iode en milieu rendu alcalin par un corps sans action sur l'iode (borax ou bicarbonates alcalins). Deux atomes d'iode correspondent à une molécule d'acide urique.

La méthode de Ronchèse joint à son extrême simplicité une précision suffisante. Son seul inconvénient réside dans sa longueur: un dosage demande environ 1½ heure et souvent davantage, la filtration de l'urate d'ammonium étant lente. Déjà Danet[1] et Renaudin[2] ont essayé de supprimer cet inconvénient, le premier en remplaçant la filtration par la centrifugation, le second en utilisant un filtre de Büchner. Nous avons eu l'idée d'opérer sur 2 cc. d'urine au lieu de 100 cc. et d'employer le microfiltre en porcelaine. Cette modification nous a permis d'établir une micro-méthode beaucoup plus rapide et aussi exacte que le procédé original.

[1] Journ. Pharm. et Chim., **6**, 405 (1927).
[2] Journ. Pharm. et Chim., **15**, 109 (1932).

Microméthode de Ronchèse.

Le principe est le même que celui de la macrométhode; l'acide urique est isolé de l'urine comme urate d'ammonium, puis est oxydé en milieu alcalin par une solution d'iode N/100

1 molécule d'acide urique = deux atomes d'iode.

Solutions nécessaires.

Iode N/100 préparée au moment de l'emploi à partir d'une solution N/10

Solution de lavage:	chlorure d'ammonium	150 gr.
	ammoniaque conc.	150 cc.
	eau	Q. S. pour 1 litre

Empois d'amidon.

Appareils: Microfiltre en porcelaine[3] composé d'une tige de porcelaine (diamètre int. 1 mm., ext. 3 mm.) de 50 mm. de longueur, à une extrémité, ce filtre s'évase et forme une surface filtrante circulaire en porcelaine poreuse.

Microbecher diam. 1 cm.; haut. 7 cm.

Microburette.

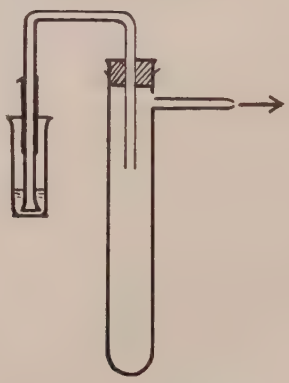


Fig. 1. Appareil à filtrer.

Appareil à filtrer, composé d'un tube en U étroit relié d'un côté au microfiltre, au moyen d'un petit tuyau en caoutchouc, et de l'autre, à une éprouvette munie d'une tubulure latérale par laquelle on fait le vide avec une trompe á eau.

[3] Fourni par P. Haack, Wien, IX./3, Garrelligasse 4.

Mode opératoire.

2 cc. d'urine sont exactement mesurés dans un microbecher et additionnés de 6 gouttes d'ammoniaque conc. et de 0,3 gr. de chlorure d'ammonium. Agiter, puis laisser reposer 5 minutes. Filtrer au moyen du microfiltre en tirant modérément à la trompe au début pour ne pas boucher les pores du filtre. Laver à 3 reprises avec chaque fois 1 cc. de la solution de lavage. Le précipité d'urate d'ammonium bien essoré adhère en partie au filtre et en partie au fond du becher. Verser dans celui-ci 1 cc. d'eau, ajouter un petit fragment de papier tournesol et goutte à goutte de l'acide acétique au dixième jusqu'a réaction acide. Dissoudre complètement l'urate en se servant du filtre comme agitateur. Alcaliniser ensuite avec un peu de borax solide et titrer avec la solution d'iode N/100 en présence d'empois d'amidon, jusqu'à coloration bleue persistant 10 à 15 secondes. L'empois d'amidon doit être ajouté vers la fin de la réaction seulement; on peut même le supprimer dans tous les cas où l'urine n'est pas anormalement colorée et prendre comme terme de la réaction la couleur brun jaune due à l'excès d'iode.

1 cc. d'iode N/100 = 0,00084 gr. d'acide urique

n cc. $\times$ 0,42 + 0,01 = quantité d'acide urique en gr./litre

0,01 représente la correction nécessitée par la faible solubilité de l'urate d'ammonium.

Grâce à la filtration à l'aide de la trompe et au fait que le précipité est dissous dans le becher même qui a servi à la précipitation et sans qu'il soit besoin de le détacher du filtre, l'opération est très rapide. Un dosage demande environ 15 minutes et donne les mêmes résultats que la macrométhode de Ronchèse, comme le prouvent les chiffres suivants:

Microméthode	Macrométhode
0,588 gr./lit.	0,584 gr./lit.
0,791 „	0,787 „
0,408 „	0,408 „

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU MICRODOSAGE DE L'URÉE DANS LE SANG.

Par

P. WENGER, CH. CIMERMAN et A. MAULBETSCH.

Laboratoire de Chimie Analytique de l'Université de Genève.

(Eingelangt am 21. Juli 1933.)

I. Etude bibliographique.

Les méthodes de dosage de l'urée par le xanthydrol.

Le dosage de l'urée est très important au point de vue clinique, aussi a-t-il fait l'objet d'une foule de travaux. Les nombreuses méthodes qui en ont résulté reposent sur les trois réactions suivantes:

a) Décomposition de l'urée par l'hypobromite.
b) Décomposition de l'urée par un ferment, l'uréase.
c) Précipitation de l'urée par le xanthydrol.

Les méthodes à l'hypobromite et à l'uréase, qui présentent de grands avantages pour les dosages cliniques, ne sont pas aussi précises que les procédés au xanthydrol. C'est FOSSE, qui après une longue série de travaux[1], a établi que le xanthydrol précipite quantitativement et uniquement l'urée dans les liquides biologiques additionnés d'acide acétique. Le composé insoluble formé est la dixanthylurée ou uréine, de formule:

$$O(C_6H_4)_2CH — NH — CO — NH — CH(C_6H_4)_2O$$

dont le poids moléculaire est 7 fois plus élevé que celui de l'urée. Cette réaction est à la base de plusieurs procédés de dosage gravimétriques, volumétriques et colorimétriques.

Les procédés gravimétriques consistent à précipiter

l'urée par une solution acétique ou méthylique de xanthydrol, dans le sérum désalbuminé et additionné de son volume d'acide acétique glacial. La condensation dure de ½ heure à 3 heures suivant les quantités mises en jeu. Après filtration, lavage et dessiccation, la dixanthylurée est pesée; son poids divisé par 7 donne le poids de l'urée.

Le procédé original de FOSSE[1], légèrement modifié par HUGOUNENQ et MOREL, FREJACQUE[2] et LAUDAT[3] s'applique à 10 cc. de sérum ce qui exclut son emploi pour des dosages répétés. Aussi plusieurs auteurs ont-ils cherché à le transformer en microméthode applicable à des quantités de sérum beaucoup plus faibles. NICLOUX et WELTER[4] opèrent sur 1, 0,5 ou même 0,3 cc. de sérum qu'ils diluent 7 fois. Le très faible précipité d'uréine est filtré sur un microcreuset de NEUBAUER en platine et pesé sur une microbalance; son poids donne le poids d'urée contenu dans 1 cc. de sérum. GUILLEMET et GOLAZ[5] effectuent la précipitation directement dans un filtre d'Jéna en verre. POLONOWSKI et AUGUSTE[6] ont signalé qu'en dosant l'urée sur du sang fluoré, on obtient des résultats trop forts; il faut éliminer le fluorure par l'acétate de calcium.

Pour éviter l'emploi de la microbalance, quelques auteurs ont établi des méthodes volumétriques dans lesquelles l'uréine, précipitée dans les mêmes conditions que précédemment, est estimée soit par oxydimétrie, soit par acidimétrie.

CORDEBARD[7] oxyde la dixanthylurée par le mélange sulfochromique dont il titre l'excés par une solution ferreuse, alors qu'ALLEN et LUCK[8] et CUNY ROBERT[9] utilisent, les premiers

[1] FOSSE, C. R. Acad. Sciences, **158**, 1076, 1432 (1914); **157**, 948 (1913). FRENKEL, Ann. Chim. anal., 234 (1920).

[2] HUGOUNENQ et MOREL, Ann. Chim. anal., 68 (1914). FREJACQUE, Ann. Chim. anal., 69 (1914).

[3] LAUDAT, Ann. Chim. anal., 18 (1928).

[4] NICLOUX et WELTER, Bull. Soc. Chim. biol., **4**, 128 (1922).

[5] GUILLEMET et GOLAZ, C. R. Soc. Biol., **101**, 726 (1929); Ann. Chim. anal., 106 (1930).

[6] POLONOWSKI et AUGUSTE, C. R. Soc. Biol., **86**, 1027 (1922).

[7] CORDEBARD, Bull. Soc. Chim. biol., **10**, 461 (1928).

[8] ALLEN et LUCK, Journ. Biol. Chem., **82**, 696 (1929).

[9] CUNY ROBERT, Bull. Soc. Chim. biol., **12**, 171 (1930).

le bichromate de potassium en présence d'iodure de potassium, le second l'iodate de potassium, et titrent l'iode libéré par l'hyposulfite de sodium. Un procédé plus rapide, mais peu précis, consiste à décolorer la solution d'uréine dans l'acide sulfurique par le permanganate[10].

Boivin[11] dose l'azote du précipité par un micro-Kjeldahl ou le carbone par la microméthode de Nicloux.

Dans les méthodes colorimétriques, de Beattie[12] et de Shunidi[13], on compare la coloration de la solution sulfurique de dixanthylurée avec celle d'étalons.

Enfin si l'on fait agir le xanthydrol directement sur le sérum non désalbuminé, il se forme une suspension d'uréine qui convient à un dosage néphélométrique[14].

L'emploi du xanthydrol pour le dosage de l'urée, étudié par Mestrezat[15], fournit des résultats rigoureux, à condition d'opérer sur du sérum dont le taux en urée a été amené à 0,50 gr. litre environ et d'utiliser une quantité de solution à 10% de xanthydrol égale au dixième de la solution acéto-uréique à traiter. La précision des résultats dépend aussi de la pureté des réactifs qui doivent être soigneusement contrôlés. L'inconvénient de la méthode réside dans la difficulté de se procurer du xanthydrol frais; ce réactif s'oxydant facilement ne peut être conservé plus de deux semaines.

II. Etude de quelques microméthodes de dosage de l'urée dans le sang.

Introduction.

Les microméthodes de dosage de l'urée sanguine au moyen du xanthydrol permettent d'obtenir des résultats très précis avec une très faible quantité de sérum et sont par là appelées à rendre de grands services dans tous les cas où l'on ne dispose que de

[10] Luck, Journ. Biol. Chem., **79**, 211 (1928).
[11] Boivin, Bull. Soc. Chim. biol., **10**, 684 (1928).
[12] Beattie, Biochem. Journ., **22**, 711 (1928).
[13] Shunidi, C., **1930**, II, 1894.
[14] Auguste, C. R. Soc. Biol., **89**, 991 (1923); **93**, 639 (1925).
[15] Mestrezat Janet, Journ. Pharm. Chim., **22**, 369 (1920).

Berger, H. Ausführung der Halbmikrobestimmung von Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff. Journ. prakt. Chem. **133**, 1—12. C., **1932**, II, 2996.

Bey, L. Vervollkommnung der Reaktion von Carrobio zum Nachweis von Spuren Resorzin. Bull. Soc. chim. France [4] **51**, 230 bis 233 (1932). C., **1932**, I, 3327.

Birckenbach, L. u. Goubeau, J. Ramaneffekt als Grundlage einer organischen Spektralanalyse. Ber. Dtsch. chem. Ges. **65**, 1140—48. C., **1932**, II, 1942.

Booth, H. S. u. Campbell, M. B. Bestimmung von Spuren von Kohlenoxyd in C_2H_4. Ind. engin. Chem. Analytical Edition, **4**, 131—34. C., **1932**, II, 1482.

Bredereck, H., Acetylbestimmung nach Freudenberg. (Halbmikro-Methode.) Angew. Chem. **45**, 241—42. C., **1932**, II. 2495.

Burger, M. Schnellmethode zur Bestimmung von Natrium und Kalium in organischen Salzen unter Verwendung geringer Substanzmengen (15 mg). Chemist-Analyst **21**, Nr. 5 (engl.). C., **1932**, II, 3921.

Bürgi, J. Zur Bestimmung der höheren Alkohole nach Komarowsky-von Fellenberg (Mikromethode). Mitt. Lebensmitteluners. Hygiene **23**, 94—95. C., **1932**, II, 139.

Ruffy, J. Beitrag zu vorstehender Arbeit (v. Burgi), daselbst S. 95—96. C., **1932**, II, 139.

Carletti, O. Farbreaktion von Menthol, Eucalyptol, Thymol. Boll. chim. farmac. **71**, 139—40. C., **1932**, I, 2871.

Chalmers, A. Nasse Mikroverbrennung von organischen Verbindungen. Ind. engin. Chem. Analytical Edition **4**, 143—44. C., **1932**, II, 1481.

Cornwell, R. T. K. Bemerkung über die Mikro-Dumas-Methode zur Bestimmung von Stickstoff. Ind. engin. Chem. Analytical Edition **4**, 42. C., **1932**, II, 97.

Das-Gupta, H. N. Neue Methode zur Bestimmung von Arsen in Organoarsenderivaten. Journ. Indian chem. Soc. **9**, 95—97. C., **1932**, II, 1808.

Daur, R. Bildung, Beständigkeit und Nachweis der Methylschwefelsäuren. Ges. Abhandl. Kenntnis Kohle **10**, 152—55. C., **1932**, II, 2032.

Pour la précipitation, on utilise des microbechers en verre d'Iéna de 15 mm. de diamètre, 45 mm. de hauteur et 7—8 cc. de volume.

La dessiccation a lieu dans l'étuve de BENEDETTI-PICHLER[13] dans laquelle on fait passer un faible courant d'air sec et où l'on place ensemble le filtre et le becher qui a servi à la précipitation.

1. Dosage gravimétrique

Etude du procédé NICLOUX-WELTER[4].

L'urée est précipitée par une solution méthylique de xanthydrol dans le sérum désalbuminé. Le précipité de dixanthylurée est filtré sur un creuset de NEUBAUER en platine et pesé sur une microbalance.

Nous avons appliqué la technique longuement décrite par les auteurs à une solution d'urée à 0,5 gr./litre préparée à partir d'urée desséchée dans le vide sur l'acide sulfurique, et dosée simultanément par la macrométhode de FOSSE:

NICLOUX-WELTER	FOSSE
0,52 gr./litre	0,501 gr./litre
0,53	
0,505	

La méthode est exacte et pour rendre son emploi plus facile, surtout pour les dosages en série, nous avons substitué au creuset de NEUBAUER le microfiltre en porcelaine décrit plus haut.

Modification du procédé NICLOUX-WELTER.

Réactifs nécessaires:

1. Acide acétique glacial exempt d'acides minéraux.
2. Réactif de TANRET: $HgCl_2$ 2,71 gr., KI 7,2 gr., CH_3COOH glacial 66,6 cc. } dans 100 cc. eau
3. Solution à 5% dans l'alcool méthylique, à préparer au moment de l'emploi, de xanthydrol frais.
4. Solutions de lavage: a) Alcool éthylique à 95° saturé de dixanthylurée.
   b) Eau saturée de dixanthylurée.

Mode opératoire:

Verser dans un tube à essais 1 cc. de sérum, 5 cc. d'eau, 1 cc. de réactif de TANRET; mélanger et filtrer au bout de 5 minutes. Prélever 1 cc. du filtrat, le placer dans un microbecher avec 1 cc. d'acide acétique glacial et 0,4 cc. de la solution de xanthydrol; mélanger avec une baguette de verre très fine. La précipitation commence au bout de 3 minutes environ. Laisser reposer une heure en agitant de temps à autre pendant les dix premières minutes. Filtrer ensuite avec le filtre en porcelaine; laver 2 fois avec 4—6 gouttes de a, 2 fois avec 3—4 gouttes de b, nouveau 2 fois avec 3—4 gouttes de a, 2 fois avec 3—4 gouttes de b et terminer avec 2 gouttes d'eau pure. Il faut avoir bien soin d'essorer entre les différents lavages; en effet, l'eau dissout très peu d'uréine et fait reprécipiter celle-ci de sa solution alcoolique; si on mélange dans le microbecher les deux solutions, on introduit de la dixanthylurée qui fausse les résultats.

Lorsque le lavage est terminé, on détache le filtre du tube en U, tout en le maintenant dans le microbecher et on le place avec celui-ci dans l'étuve de BENEDETTI-PICHLER. On dessèche à 105°—110° dans un faible courant d'air pendant 30 minutes. Le tube de l'étuve est alors placé à côté de la balance pendant 10 minutes, après lesquelles on retire le microbecher contenant le filtre, l'essuie avec une peau de daim et le pose sur un petit bloc de nickel placé dans la cage de la balance; au bout de 10 minutes le refroidissement est complet et on pèse au centième de milligramme. Pendant toutes ces opérations, le becher n'est manié qu'au moyen de pinces, jamais avec les doigts.

n mgr. $\frac{7}{7} 1000 =$ mgr. d'urée / litre de sérum.

$n/7 =$ mgr. trouvés en urée,

$n\,7\,.\,7 =$ mgr. d'urée dans 1 cc. de sérum,

$n/7\,.\,7\,.\,1000 =$ mgr. d'urée par litre de sérum,

de telle sorte que l'on peut simplifier l'expression et que n = grammes d'urée par litre de sérum.

Avant chaque dosage, le filtre et le becher sont lavés avec du mélange sulfochromique chaud, rincés, séchés et pesés exactement

dans les mêmes conditions de température, durée, etc., que celles de dosage.

Cette méthode a donné les résultats suivants:

a) Dans une solution aqueuse à 0,50 gr./litre

0,48 gr./litre	0,50	0,50

b) Dans du sérum

1. 0,68 gr./litre	0,67	0,68
2. 0,79 »	0,80	0,82

c) Dans du sérum à 0,80 gr./litre additionné de quantités variables d'une solution aqueuse d'urée à 0,50 gr. litre.

			Trouvé
1.	1 cc. sérum + 0,52 cc. sol. aq.	soit 1,06 gr./litre	1.07 gr. litre
2.	1 cc. » + 0,78 cc. » »	» 1,19 »	1,22 »
3.	1 cc. » + 1,20 cc. » »	» 1,40 »	1,46 »
4.	0,5 cc. » + 0,50 cc. » »	» 0,65 »	0,62 »

Le dosage est aussi exact et rapide que dans le procédé de NICLOUX-WELTER.

2. Dosage volumétrique

Modification du procédé ALLEN-LUCK.

Pour éviter l'emploi de la microbalance toujours délicat, nous avons remplacé l'estimation gravimétrique de la dixanthylurée par un dosage volumétrique emprunté à la méthode ALLEN-LUCK[8]. Dans ce procédé, la dixanthylurée séparée du sérum par centrifugation, est traitée par le mélange sulfochromique qui l'oxyde rapidement en acide carbonique, ammoniaque et eau suivant l'équation:

$$3\,CO\,(NH\,.\,CH\,[C_6H_4]_2O)_2 + 58\,K_2Cr_2O_7 + 235\,H_2SO_4 =$$
$$= 58\,Cr_2(SO_4)_3 + 58\,K_2SO_4 + 3\,(NH_4)_2SO_4 + 235\,H_2O + 81\,CO_2.$$

L'excès de bichromate est titré par l'hyposulfite de sodium en présence d'iodure de potassium:

$$Cr_2O_7^{--} + 6\,J^- + 14\,H^+ \rightarrow 3\,J_2 + 2\,Cr^{+++} + 7\,H_2O.$$
$$J_2 + 2\,S_2O_3^{--} \rightarrow 2\,J^- + S_4O_6^{--}.$$

1 gramme d'uréine exige pour son oxydation 13,54 gr. de bichromate, 1 cc. de bichromate N/10 = 0,0518 mgr. d'urée.

Mode opératoire.

Solutions titrées et réactifs:

1. Solution à 5% de xanthydrol dans l'alcool méthylique pur.
2. Réactif de TANRET.
3. Eau et alcool éthylique à 95° saturés de dixanthylurée.
4. Acide acétique glacial pur.
5. Solution de bichromate de potassium N.
6. Solution d'hyposulfite de sodium N/10.
7. Solution d'iodure de potassium à 10%.
8. Empois d'amidon.

La défécation, la précipitation et la filtration de la dixanthylurée se font de la même manière que dans la méthode précédente. Puis le microbecher contenant le filtre de porcelaine et le précipité d'uréine est placé dans une étuve ordinaire pendant 15 minutes ou 5 minutes dans l'étuve de BENEDETTI-PICHLER pour éliminer complètement l'alcool. On verse ensuite dans le becher 1 cc. exactement mesuré de la solution normale de bichromate et 1,5 cc. d'acide sulfurique concentré. On mélange en se servant du filtre comme agitateur; l'élévation de température qui se produit facilite l'oxydation, qui est complète au bout de 2 à 3 minutes. On relie de nouveau le filtre à l'appareil à filtrer et aspire la solution sulfochromique et la recueille dans un cylindre de 50 cc. grâce au dispositif décrit dans l'introduction. On lave le becher et le filtre 3 fois avec 2 cc. d'eau. On dose l'excès de bichromate directement dans le cylindre: on dilue à 20 cc. avec de l'eau distillée, on ajoute 10 cc. d'iodure de potassium à 10% et laisse couleur la solution d'hyposulfite N 10; lorsque la coloration brune a presque disparu, on ajoute quelques gouttes d'amidon et on termine le titrage jusqu'à virage du bleu au vert clair.

Soit n le nombre de cc. d'hyposulfite employés.

(10-n) 0,0518 . 7 = (10-n) 0,3626 = Quantité d'urée en gr./litre de sérum.

Vérification de la méthode.

a) Dans une solution aqueuse d'urée à 0,5 gr./litre, le titre trouvé par la microméthode a été de:

0,502 gr./litre 0,486 0,501

b) Dans du sérum dont le titre, déterminé par plusieurs dosages est de 0,38 gr. litre et additionné de quantités variables de la solution aqueuse d'urée à 0,5 gr./litre.

		Trouvé
1. 1 cc. sérum + 0,77 cc. sol. aq. soit 0,765 gr./litre		0,76 gr. litre
		0,76 »
2. 1 cc. » + 1,02 cc. » » » 0,89 »		0,90 »
		0,91 »

Remarque: On peut substituer au filtre en porcelaine, le filtre en verre avec amiante décrit plus haut; dans ce cas, il faut dessécher beaucoup plus longtemps dans l'étuve de Benedetti Pichler, au moins ½ heure à ¾ heure, car l'amiante adsorbe fortement l'alcool de lavage.

Cette méthode qui sépare la dixanthylurée par filtration au lieu de centrifugation, est beaucoup plus rapide que le procédé d'Allen Luck et les méthodes gravimétriques, tout en étant aussi exacte.

Conclusion.

Les microméthodes de dosage de l'urée sanguine, dites au xanthydrol, sont intéressantes, car elles permettent des dosages très précis sur de faibles quantités de sérum; elles présentent néanmoins plusieurs inconvénients: longue durée, matériel coûteux, etc. Les recherches faites en vue de diminuer ou de supprimer ces désavantages, ont conduit à modifier la technique des procédés Nicloux-Welter et Allen-Luck: dans le procédé gravimétrique de Nicloux-Welter, le creuset de Neubauer en platine est remplacé par un microfiltre en porcelaine; dans le procédé volumétrique d'Allen-Luck, la centrifugation du précipité est remplacée par la filtration au moyen de microfiltres.

Les deux méthodes établies, plus rapides et ne nécessitant qu'un appareillage de microanalyse très simple, sont applicables à 1 cc. de sérum et donnent des résultats précis.

Contribution a l'étude du microdosage du calcium dans le serum sanguin.

Par

P. Wenger, Ch. Cimerman et P. Borgeaud.

Laboratoire de Chimie Analytique de l'Université de Genève.

(Eingelangt am 21. Juli 1933.)

INTRODUCTION.

Lorsqu'on fait l'étude bibliographique complète[1] des méthodes de dosage du calcium dans le sérum sanguin, on constate que celles-ci existent en très grand nombre et qu'on peut les classer, d'après le principe sur lesquelles elles reposent en:

A. Méthodes colorimétriques.
B. Méthodes néphélométriques.
C. Méthodes volumétriques.
D. Méthodes gravimétriques.

Parmi ces procédés, c'est le dosage volumétrique, avec précipitation préalable du calcium comme oxalate, qui est le plus important et le plus étudié.

La plupart des auteurs, après avoir précipité le calcium comme oxalate, lavent le précipité, le dissolvent dans l'acide sulfurique et titrent l'acide oxalique ainsi libéré, par le permanganate de potassium. Sur certains points cependant, les auteurs ne sont pas d'accord, leurs opinions sont même parfois contradictoires. C'est pourquoi, il nous a semblé intéressant de reprendre, au point de vue expérimental, les différents facteurs qui peuvent influencer l'exactitude du dosage.

Nous procèderons donc à une étude critique de cette méthode et.

[1] Cette étude fera l'objet d'un mémoire séparé.

d'autre part, nous étudierons les méthodes gravimétriques dont nous montrerons l'application au dosage du calcium dans le sérum sanguin.

I. Etude critique des méthodes volumétriques manganimétriques à l'oxalate.

Les différents facteurs que nous allons successivement étudier sont:

1. la température et les conditions du virage,
2. la centrifugation et la filtration,
3. l'eau de lavage,
4. le pH de la solution lors de la précipitation,
5. l'influence du rouge de méthyle,
6. la minéralisation à la flamme nue et au four électrique.
7. la précipitation directe.

Principe de la méthode à l'oxalate: Le calcium est précipité comme oxalate, celui-ci est dissous dans l'acide sulfurique et l'acide oxalique ainsi libéré est titré par le permanganate de potassium.

Toute étude critique devant commencer par un dosage sur une solution de titre connu, nous avons tout d'abord préparé une solution titrée de chlorure de calcium: 10 gr. de chlorure de calcium puriss ont été dissous dans 1 litre d'eau distillée. Le calcium contenu dans la solution ainsi obtenue a été dosé par une prise de 20 cc. soit volumétriquement, soit gravimétriquement. Par dilution de cette solution, nous avons obtenu une concentration en calcium voisine de celle du sérum sanguin humain, soit environ 100 mgr./lit.

Nous savons que, pour le titrage, on emploie une solution de permanganate centième normale, nous l'avons préparée par dilution de la solution dixième normale, celle-ci ayant été titrée par l'oxalate de sodium.

Etude des facteurs.

Pour cette étude, nous avons procédé comme suit: à 2 cc. de notre solution titrée de calcium contenant 0,2 mgr., nous avons ajouté à l'ébullition 0,5 cc. d'oxalate d'ammonium en solution saturée. Après une heure nous avons filtré avec un micro-filtre d'amiante, puis lavé avec 4 cc. d'eau distillée, dissous dans de l'acide

sulfurique au cinquième et titré à chaud par une solution centième normale de permanganate de potassium.

1. *Température de virage.* Les différents auteurs ne donnent pas toujours des indications précises concernant la température choisie pour le titrage et le temps pendant lequel la coloration rose doit persister pour que le virage soit considéré comme exact. Nous avons fait une série d'essais sur la solution titrée de chlorure de calcium dont 1 cc. contient 0,1 mgr. de calcium. Le titrage au moyen de la solution de permanganate centième normale a été effectué à 60°, 70° et 80°, la solution étant portée 1 minute au bain-marie après la première coloration rose.

Il n'y a pas grande différence entre les résultats des essais titrés à 60° et à 70°, tandis qu'à 80°, la première coloration ne persiste pas 1 minute au bain-marie; si l'on ajoute alors le permanganate jusqu'à rose persistant, on obtient des résultats qui se rapprochent de ceux trouvés à 60°, 70°; cette constatation nous a amené à examiner s'il n'y aurait pas là une destruction du permanganate par la chaleur, la solution étant très diluée (N 100).

Nous avons constaté que ce n'était pas le cas.

La température adoptée pour les essais subséquents a été celle de 70°, la première coloration rose persistant 1 minute au bain-marie à 70°; ceci pour une raison d'ordre pratique, l'exactitude étant à peu de chose près la même à 60°, 70° et à 80°, à savoir qu'à 60°, la solution se refroidit trop vite pendant le titrage, et qu'à 80°, la première coloration rose ne persiste pas.

Dans le cas du dosage du calcium par précipitation directe dans le sérum, nous avons réduit la persistance de la coloration à 30 secondes, ceci en raison des matières organiques qui adhèrent généralement au précipité et qui réduisent le permanganate.

2. *Centrifugation et filtration.* Plusieurs auteurs signalent le fait que le précipité d'oxalate de calcium grimpe le long des parois du tube à centrifuger au cours des différents lavages[2].

C'est pourquoi nous avons essayé de substituer la filtration à la centrifugation, pensant éviter ainsi une cause d'erreur. A cet

[2] Blühdorn-Genck, Biochem. Ztschr., **135**, 581 (1923); Jonkers-Revers Ztschr. physiol. Chem., **144**, 181 (1925); Bigwood-Roost, Bull. soc. chim. biol., **13**, 1214 (1931).

effet, nous avons utilisé des « baguettes » microfiltrantes (Filterstäbchen): *l'une en porcelaine* déjà employée par VIDMARK et VAHLQUIST[3] pour le dosage du calcium dans le sang et les tissus; *l'autre en verre* garnie d'amiante non encore utilisée jusqu'ici pour le dosage du calcium dans le sérum.

Emploi du microfiltre de porcelaine.[4]

Ce microfiltre est composé d'une tige de porcelaine de 5 cm. environ; à une extrémité, il s'évase et forme une surface filtrante circulaire en porcelaine poreuse (fournisseur: Staatliche Porzellan-Manufaktur, Berlin). L'appareil à filtrer se compose d'un tube en U étroit relié d'un côté au microfiltre, au moyen d'un petit tuyau en caoutchouc, et de l'autre à une éprouvette munie d'une

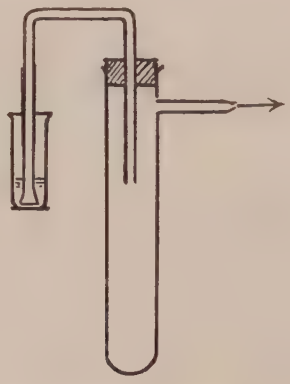


Fig. 1. Appareil à filtrer.

tubulure latérale par laquelle on fait le vide avec une trompe à eau; dans cette éprouvette, on peut placer un récipient plus petit, soit pour le contrôle des eaux de lavage, soit pour recueillir le filtrat en vue du dosage du magnésium.

La précipitation, la filtration et le titrage se font dans le même « microbecher » (dim.: hauteur 4 cm., diamètre 1,5 cm.)

Il n'y a donc aucun transvasage.

[3] VIDMARK-VAHLQUIST, Bioch. Ztschr., 230, 245 (1931).

[4] E. SCHWARZ-BERGKAMPF, Ztschr. analyt. Chem., **69**. 327 (1926).

Voici les résultats obtenus:

Prise	Valeur théorique en calcium	Valeur trouvée calculée en calcium
2 cc. sol. diluée en $CaCl_2$	100 mgr./lit.	102 mgr./lit.
		100 » »
		102 » »

Prise	Valeur théorique en calcium	Valeur trouvée calculée en calcium
$CaCO_3$ séché à poids constant		
0,58 mgr.	0.232 mgr.	0.2305 mgr.
0,48 »	0.192 »	0.195 »
0,49 »	0.196 »	0.200 »
0,49 »	0.196 »	0.200 »
0,49 »	0,196 »	0,200 »

L'erreur absolue est comprise entre 0 et 2%.

Le titrage est un peu délicat par le fait que le précipité d'oxalate de calcium ne se dissout pas entièrement dans l'acide sulfurique si l'on ne souffle pas dans la tige du filtre vers la fin du titrage. Des essais ont été faits sans souffler dans le filtre et les résultats trouvés ont été trop faibles. Cette manière de procéder est donc nécessaire, et l'on est parfois obligé de souffler à plusieurs reprises dans la tige du filtre jusqu'à ce qu'il ne se produise plus de décoloration dans la solution. Le filtre sert comme agitateur. Pour le dosage du calcium par précipitation directe dans le sérum, ce filtre est très approprié, car la filtration se fait assez rapidement.

Voici les résultats obtenus sur deux sérums différents:

sérum A.	Prise 1 cc.	98,30 mgr./lit.
		96,10 » »
sérum B.	Prise 2 cc.	104 » »
		103 » »

La concordance est donc satisfaisante (1 à 2%).

Emploi du microfiltre de verre[5] (amiante).

Celui-ci comprend une tige de verre de 8 cm. de long qui se rétrécit puis s'évase à une extrémité; cet espace élargi est rempli

[5] HÄUSLER, Ztschr. analyt. Chem., **64**, 362 (1924).

d'amiante. Celle-ci doit être purifiée: dans ce but, on la fait digérer au bain-marie avec de l'acide nitrique concentré; au bout de quelques heures, on filtre sur un entonnoir en porcelaine et lave à l'eau bouillante jusqu'à élimination de l'ion nitrique. L'amiante est séchée à l'étuve à 100° et conservée dans un flacon bouché. L'appareil à filtrer est identique à celui que nous avons décrit à propos du filtre de porcelaine.

Fig. 2. Microfiltre de verre.

Voici quelques résultats obtenus avec le filtre de verre:

Prise	Valeur théorique en calcium	Valeur trouvée calculée en calcium
2 cc. sol. diluée $CaCl_2$	100 mgr./lit.	100 mgr./lit.
		100,9 » »
		99,1 » »
		100,9 » »
		98,2 » »
		101,8 » »

On voit que l'erreur est sensiblement la même qu'avec le filtre de porcelaine.

Pour la précipitation directe du calcium dans le sérum, ce filtre est moins pratique que le précédent; même si l'on a soin de diluer le sérum, la filtration est parfois extrêmement lente. Par contre, la fin du titrage est plus nette, toute l'amiante doit être soufflée dans le becher et la première coloration rose est facile à saisir; en faisant des essais à blanc (qui consistent à mettre dans le microbecher 5 cc. d'eau distillée, 0,5 cc. d'acide sulfurique concentré et un peu d'amiante, et à titrer à chaud par le permanga-

nate), nous avons constaté qu'il faut déduire 0,01 cc. au volume de permanganate trouvé; ceci est probablement dû à une absorption de la coloration par l'amiante plutôt qu'à une action réductrice de celle-ci sur le permanganate. Voici quelques dosages opérés à double sur des sérums en utilisant ce filtre:

Sérum A	99,3	mgr./lit.	Sérum B	104	mgr./lit.
	98	» »		102	» »
Sérum C	97	» »	Sérum D	96 2	» »
	100	» »		96,2	» »

L'erreur varie de 0 à 3% quand la prise est de 2 cc. Sur 1 cc., le dosage est forcément moins exact. Autant que possible, nous avons toujours fait dosages à double et sur 2 cc. de sérum.

Pour compléter cette étude, nous avons procédé à un *dosage comparatif sur le même sérum, par précipitation directe en employant des filtres différents:*

filtre d'amiante:	95 mgr./lit.
filtre de porcelaine:	94 » »

La concordance est donc satisfaisante.

Enfin, nous avons effectué des *dosages comparatifs sur le même sérum, par minéralisation, en centrifugeant une fois et en filtrant l'autre fois:*

par centrifugation	100,6 mgr./lit.
par filtration (filtre d'amiante)	102,0 » »

Ici aussi, la concordance est bonne.

Conclusion: Nous préférons la filtration à la centrifugation, d'abord parce qu'elle élimine la possibilité d'une perte en calcium lors du siphonage, puis parce que nous pensons qu'avec la même quantité d'eau de lavage, l'élimination de l'oxalate d'ammonium en excès se fait mieux; enfin, et cette raison est d'ordre purement pratique, parce que la filtration et le lavage ne demandent aucune surveillance, avantage qui n'est pas à négliger. La filtration et le lavage prennent environ un quart d'heure. Il est évident que, pour des dosages en série, la centrifugation est un peu plus rapide, puisqu'on peut centrifuger généralement plusieurs tubes à la fois.

3. *Eau de lavage.* Nous rappelons que les eaux de lavage employées sont: l'eau distillée, l'ammoniaque à 2%, l'alcool-éther, une solution saturée d'oxalate de calcium.

En opérant sur la solution titrée de chlorure de calcium, les résultats ont été sensiblement les mêmes en lavant, soit avec 6 cc. d'eau distillée, soit avec 6 cc. d'ammoniaque à 2% (erreur de 0 à 2%). L'eau de lavage est ajoutée par portions de 2 cc. et l'écoulement doit se faire goutte à goutte, une filtration trop rapide entraînant un lavage incomplet. Le lavage du précipité d'oxalate de calcium est des plus importants; comme le dit MESTREZAT[6], il vaut mieux laver à fond le précipité et faire une correction de solubilité si cela est nécessaire. L'ion oxalique a été recherché dans les eaux de lavage au moyen du nitrate d'aregnt, ceci pour le lavage à l'eau distillée; après 6 cc. il n'y a plus de précipité d'oxalate d'argent, et les résultats sont satisfaisants. Ceux-ci variant en général de 0 à 2% en trop, nous n'avons pas jugé nécessaire d'apporter une correction de solubilité.

Cependant, lors de la précipitation directe du calcium dans le sérum, l'ammoniaque à 2% est préférable à l'eau, car elle a l'avantage de dissoudre, partiellement du moins, les impuretés organiques qui adhèrent au précipité d'oxalate de calcium.

Nous avons essayé d'employer l'eau de lavage préconisée par VELLUZ-DESCHASEAUX[7], c'est-à-dire un mélange d'eau-alcool-éther, puis d'alcool-éther et enfin le dernier lavage se fait à l'éther seul.

Soit avec le filtre de porcelaine, soit avec le filtre d'amiante, les résultats obtenus ont été beaucoup trop forts. Bien que le microbecher et le filtre aient été mis au bain-marie bouillant pendant un quart d'heure, il a dû rester de l'éther non évaporé qui réduit fortement le permanganate; nous avons constaté que 2 cc. d'éther, en solution sulfurique, réduisent 5,3 cc. de permanganate N 100. Ce mode de lavage à l'alcool-éther n'est donc pas applicable au cas qui nous intéresse.

Une autre tentative a été faite avec une solution saturée d'oxalate

[6] MESTREZAT, Bull. soc. biol., **5**, 263 (1923).

[7] VELLUZ-DESCHASEAUX, Bull. soc. chim. biol., **13**, 797 (1931); C. R. soc. biol., **104**, 976 (1930).

de calcium[8]. Théoriquement, c'est l'eau de lavage idéale par le fait que, d'une part, il n'y a aucune perte à craindre par solubilité du précipité dans sa solution saturée et, d'autre part, le volume de solution restant après le dernier lavage n'étant qu'une fraction de cc., son action sur le permanganate est négligeable. Pratiquement, nous avons obtenu des résultats environ 10% trop forts, en travaillant sur la solution titrée de calcium. Dans nos essais subséquents, nous avons adopté comme eau de lavage l'ammoniaque à 2% pour les raisons déjà indiquées.

4. *PH de la solution lors de la précipitation de l'oxalate de calcium*[9]. Cette étude a été faite sur une solution dite « sérum artificiel » préparée par GUILLAUMIN[10] et contenant dans un litre d'eau distillée:

NaCl	8,6 gr.	$MgSO_4$	0,25 gr.
K_2SO_4	0,46 »	$(NH_4)_2HPO_4$	0,15 »
$CaCO_3$	0,25 »		

1 cc. de cette solution contient 0,1 mgr. de calcium.

Nous avons effectué une série de dosages avec une prise de 2 cc. de sérum artificiel en opérant à des pH différents, contrôlés par l'indicateur universel de MERCK.

Entre les pH 4 et 8,5, les différences sont minimes; l'influence du pH est donc faible; dans nos essais subséquents, nous avons adopté le pH 5 pour la précipitation de l'oxalate de calcium; c'est la zone de virage du rouge de méthyle.

5. *Influence du rouge de méthyle.* Afin de savoir si oui ou non le rouge de méthyle avait une influence perturbatrice sur le dosage du calcium, nous avons fait plusieurs essais sur la solution titrée de chlorure de calcium; dans les uns, le calcium a été directement précipité par l'oxalate d'ammonium, dans les autres, nous avons préalablement ajouté une goutte d'une solution alcoolique de rouge de méthyle. Les résultats ont été identiques (à 1% près), si bien que nous en avons conclu que le rouge de méthyle n'influençait

[8] PANTON-MARRACK, Clinical Pathology, p. 123. — TWEEDY-KOCH, C., **1929**. II, 1189. — STANFORD-WHEATLEY, Biochem. Journ., **19**, 710 (1925). — KIRK-SCHMIDT, Journ. Biol. Chem., **83**, 311 (1929).

[9] SHOHL, Journ. Biol. Chem., **50**, 527 (1922).

[10] GUILLAUMIN, Journal med., **14**, 402 (1925).

pas le dosage et pouvait être employé sans risquer d'introduire une cause d'erreur.

6. *Minéralisation à la flamme nue et au four électrique.* Bon nombre d'auteurs font précéder le dosage du calcium dans le sérum d'une *minéralisation*, c'est-à-dire qu'avant de précipiter le calcium, ils évaporent le sérum à sec, le calcinent à haute température pour détruire complètement les matières organiques et n'obtenir qu'un résidu de cendres blanches; selon eux, c'est même le seul procédé tout à fait rigoureux pour avoir un bon dosage de calcium total.

Nous allons maintenant examiner deux modes de minéralisation:

a) Minéralisation au four électrique.

2 cc. de sérum sont évaporés à sec au bain-marie dans une capsule de platine, puis chauffés graduellement au four électrique. Vers 500°, le résidu noir se boursoufle, au bout d'1 heure la température monte à 450°, la structure du résidu est alors très fine; mais ce n'est qu'à 700°, au bout d'une heure vingt, que la destruction est complète et que les cendres sont blanches. Nous avons essayé de laisser le sérum plusieurs heures à 500° (température indiquée par BIGWOOD-ROOST[11]), mais sans parvenir à une minéralisation complète.

Technique de dosage employée: les cendres blanches sont humectées de deux gouttes d'acide chlorhydrique concentré, puis de 2 à 3 cc. d'eau distillée; on transvase dans un microbecher en ayant soin de bien rincer la capsule de platine. Après addition d'une goutte de rouge de méthyle, on ajoute de l'ammoniaque concentré jusqu'au virage, puis de l'acide acétique jusqu'à coloration rose pâle; on met le «microbecher» quelques minutes au bain-marie bouillant et on laisse tomber goutte à goutte 0.5 cc. d'une solution saturée d'oxalate d'ammonium (ceci pour une prise de sérum de 2 cc.). Après avoir laissé reposer une heure, on filtre (ces essais-là ont été faits avec le filtre d'amiante), on lave avec 6 cc. d'ammoniaque à 2%, on dissout dans l'acide sulfurique et on titre par le permanganate N/100.

[11] BIGWOOD-ROOST, Bull. soc. chim. biol., **13**, 1214 (1931).

b) Minéralisation à la flamme nue.

On évapore à sec 2 cc. de sérum au bain-marie, puis on calcine au début sur une toute petite flamme; peu à peu le résidu se carbonise, prend feu parfois, ce qu'il faut éviter autant que possible en chauffant très graduellement. Au bout de 5 minutes, on peut calciner plus fortement et la minéralisation ne s'effectue complètement que sur la grande flamme d'un bec Téclu. Le tout dure 10 minutes à un quart d'heure. La suite de la méthode est identique à la précédente.

Des essais de dosage de calcium, dans le sérum, avec minéralisation préalable au four électrique, nous ont montré que pour obtenir des résultats corrects, il faut porter la température à 900°. A 500°, la température n'est pas suffisamment élevée pour une minéralisation complète. Entre 700° et 900°, bien que la minéralisation soit complète, on trouve des résultats faibles et discordants.

Par minéralisation à la flamme nue, par contre, les essais de dosage de calcium ont donné de bons résultats.

La calcination à la flamme nue, de beaucoup la plus simple, est celle que nous avons adoptée pour la suite de nos essais. Ce mode de calcination est tout aussi rapide que la destruction nitro-perchlorique de Guillaumin[12] et a l'avantage de ne pas introduire de calcium dans l'analyse. Nous n'avons pas constaté, comme le font certains auteurs, qu'il fût difficile d'obtenir des cendres exemptes de charbon. Cependant, dans certains cas, la destruction des matières organiques est plus lente, par exemple pour les sérums riches en pigments biliaires (ictères, etc.).

7. *Précipitation directe.* Résumé de la méthode: La prise est de 2 cc. de sérum frais que l'on dilue à 4 cc. avec de l'eau distillée: on précipite le calcium comme oxalate, on laisse reposer ½ à 12 sulfurique à 20% et on titre avec du permanganate de potassium N/100 à 70° (coloration persistant 30 mirutes au bain-marie à 70°).

Bien que moins précise, la précipitation directe du calcium

[12] Guillaumin, Bull. soc. chim. biol., **12**, 1269 (1930).

comme oxalate dans le sérum sanguin est généralement adoptée pour les dosages courants[13].

La durée de contact entre le précipité l'oxalate de calcium et la solution n'est pas bien déterminée. Certains auteurs centrifugent au bout d'une demi-heure, d'autres seulement après douze heures. Quelques essais sur divers sérums nous ont donné les résultats suivants·

Sérum D	filtré	au	bout	d'	1	heure		109	mgr./lit.
»	»	»	»	»	de	12	heures	111	» »
Sérum E	»	»	»	»	3	»		90	» »
»	»	»	»	»	»	4	»	90	» »
Sérum F	»	»	»	»	2	»		98	» »
«	«	»	»	»	»	48	»	96	» »

Les différences, peu sensibles, sont de l'ordre de grandeur des erreurs d'expériences.

Nous avons adopté douze heures comme durée de précipitation. Avant d'ajouter l'oxalate d'ammonium, il est bon de diluer le sérum avec le même volume d'eau distillée, la viscosité diminuant ainsi, la vitesse de précipitation augmente.

Une autre question se pose, celle de savoir si tout le calcium est bien précipité par l'oxalate d'ammonium au sein même du sérum; les différents auteurs ne sont pas d'accord sur ce point.

Nous avons recherché le calcium dans le filtrat de la précipitation directe en le minéralisant.

	Calcium retrouvé dans le filtrat
Sérum filtré après ¼ d'heure:	6,8 mgr./lit.
» » » ½ heure:	8,16 » »
» » » 12 heures:	6,8 » »
» » » 16 »	9,5 » »

La précipitation directe dans le sérum n'est donc pas complète, même après 12 ou 16 heures.

Pour terminer, nous avons fait des dosages comparatifs opérant sur une prise par minéralisation, sur l'autre par précipitation directe. En voici quelques résultats:

---

[13] De Waard, Biochem. Ztschr., **97**, 186 (1919). — Kramer-Tisdall, Journ. Biol. Chem., **47**, 475 (1921). — Clark, Journ. Biol. Chem., **49**, 487 (1921).

	Par minéralisation	par précipitation directe
Sérum A	98,06 mgr./lit. Ca	108,09 mgr./lit. Ca
» B	95,3 » » »	103,5 » » »
» C	113,0 » » »	117,8 » »
» D	92,6 » » »	100,7 »
» E	98,06 » » »	103,5 » »
» F	90,0 » » »	95,0 » »
» G	93,0 » » »	98,0 » »
» H	102,0 » » »	103,0 » » »

Conclusion: I. Il est nécessaire de laisser le précipité d'oxalate en contact avec la solution pendant au moins douze heures; bien que, suivant les cas, la précipitation soit complète au bout d'une heure, dans d'auteurs elle ne l'est pas; cela dépend de la viscosité et de la teneur en albumines du sérum.

II. Même après 12 à 16 heures de contact, le calcium n'est pas entièrement précipité du sérum.

III. La méthode par précipitation directe donne la plupart du temps des résultats plus élevés que la minéralisation. Nous arrivons donc à la conclusion que la minéralisation est nécessaire si l'on veut avoir un dosage quantitatif de calcium dans le sérum sanguin.

II. Etude critique de quelques microméthodes gravimétriques de dosage du calcium comme oxalate en vue de leur application au dosage du calcium dans le sérum sanguin.

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de microméthodes gravimétriques se rapportant au dosage du calcium dans le sérum. Les microméthodes actuelles nous ont semblé pouvoir s'appliquer à ce dosage.

Méthode d'Emich[14]. On dissout du carbonate de calcium dans 1 cc. d'eau distillée, puis on ajoute 5 gouttes d'acide chlorhydrique concentré en ayant soin de tenir le microbecher obliquement pour éviter les pertes dues au dégagement du gaz carbonique; on chauffe doucement, puis on ajoute 0,5 cc. d'acide oxalique à 3% et 1 goutte de rouge de méthyle; puis, à l'ébullition, on verse de l'ammoniaque à 2% jusqu'au virage. Après avoir laissé reposer 1 heure sous une cloche de verre, on filtre avec un filtre d'amiante, on lave 5 fois

[14] Fr. Emich, Mikrochemisches Praktikum, 1931, p. 130.

avec ½ cc. d'eau distillée, on sèche à 105 degrés dans un courant d'air (on emploie à cet effet un «bloc de séchage» (Trockenvorrichtung)[15]. On pèse comme oxalate de calcium avec 1 molécule d'eau.

Nous avons taré le microbecher et le filtre rempli d'amiante au moyen de la microbalance, en faisant filtrer un peu d'eau distillée, puis en séchant un quart d'heure à 105° et en refroidissant toujours dans un courant d'air sec, privé d'anhydride carbonique.

Les premiers essais sur la solution diluée de chlorure de calcium nous ont donné des résultats beaucoup trop faibles; cependant, en dissolvant l'oxalate pesé dans l'acide sulfurique et en le titrant par le permanganate, les valeurs ainsi obtenues ont été théoriques, donc les résultats trop faibles du dosage gravimétrique provenaient d'une perte d'amiante lors de la filtration. Pour éviter cette perte, nous avons placé au fond du filtre une petite rondelle d'étoffe de tamis (à 200 mailles/mm²); à l'intérieur, nous avons placé une petite bille de verre, puis rempli avec de l'amiante. Nous avons ainsi obtenu le poids constant du filtre et du microbecher.

Les essais suivants ont été faits à partir de carbonate de calcium pur et séché à poids constant à 100°.

Prise de $CaCO_3$ en mgr.	Poids théoretique de $CaC_2O_4 . H_2O$	Poids de $CaC_2O_4 . H_2O$ trouvé avec correction de solubilité en mgr.	Poids de $CaC_2O_4 . H_2O$ trouvé sans correction de solubilité en mgr.
2,55	3,72	3,714	3,70
1,49	2,175	2,174	2,16
1,19	1,737	1,724	1,71
0,75	1,095	1,104	1,09
0,48	0,70	0,754	0,74
0,48	0,70	0,734	0,72

Les résultats sont satisfaisants (moins de 1 et demi % d'erreur) jusqu'à une prise de 0,75 mgr. de carbonate de calcium, ce qui correspond à 3 cc. de sérum. Cette méthode est donc applicable au dosage du calcium dans le sang. Nous avons pensé qu'il était justifié d'apporter aux résultats trouvés une correction de solubilité due au lavage; nous avons pris les chiffres indiqués dans

[15] Ibid., p. 66. — Mikrochemie, PREGL-Festschrift, p. 6 1929.

Gmelin-Kraut's[16] par Kohlrausch, soit 5,6 mgr. d'oxalate de calcium par litre d'eau.

Méthode de Strebinger[17]. A une solution titrée de chlorure de calcium, on additionne 2 à 3 gouttes d'acide acétique glacial, on chauffe à 70° et on ajoute la solution saturée d'oxalate d'ammonium diluée de moitié; après un repos d'une heure, on filtre la solution et on lave alternativement à l'eau et à l'alcool; on sèche à 105° et on pèse.

Nous avons opéré selon cette méthode, sauf que nous avons lavé exclusivement à l'eau. Nous avons essayé ensuite de laver avec une solution saturée d'oxalate de calcium, supprimant ainsi la correction de solubilité. Théoriquement, la quantité de solution qui reste dans le filtre après le dernier lavage est si faible que la charge en oxalate qui en résulte est négligeable. Cependant, ayant trouvé des résultats nettement trop élevés, nous avons lavé avec 4 cc. de la solution saturée d'oxalate de calcium et 1 cc. d'eau distillée pour enlever les traces d'oxalate.

Voici le tableau réunissant les divers résultats obtenus avec cette méthode de précipitation en milieu acétique et en faisant varier l'eau de lavage:

Prise de $CaCO_3$ en mgr.	Poids théorique de $CaC_2O_4.H_2O$	Poids de $CaC_2O_4.H_2O$ trouvé avec correction de solubilité	sans correction de solubilité	Eau de lavage
0,96	1,401	1,392	1,37	4 cc. H_2O
0,62	0,905	0,922	0,90	
0,57	0,832	0,802	0,78	
0,99	1,44		1,55	6 cc. solution
0,90	1,30		1,37	saturée d'oxa-
0,87	1,27		1,29	late de Ca
0,50	0,75		0,76	
1,6	2,336		2,34	4 cc. solution
0,77	1,124		1,115	saturée d'oxa-
0,50	0,73		0,74	late de Ca Puis 1 cc. H_2O

[16] Gmelin-Kraut's, II, 2, p. 338. — Kohlrausch. Ztschr. physikal. Chem., **50**, 355 (1905).

[17] Mikrochemie, Pregl-Festschrift, p. 321 (1929).

On voit que les résultats les plus exacts ont été obtenus en lavant successivement avec 4 cc. de la solution saturée d'oxalate de calcium et 1 cc. d'eau distillée; l'oxalate de calcium seul donnant des résultats beaucoup trop élevés.

L'exactitude des résultats trouvés est de 1% environ; nous avons appliqué cette méthode au dosage du calcium dans le sérum sanguin:

Le sérum est minéralisé, on reprend soit par l'acide chlorhydrique, soit directement par l'acide acétique glacial, suivant qu'on opère d'après la méthode d'EMICH, ou par celle de STREBINGER.

Pour terminer cette étude, nous avons comparé la méthode gravimétrique de STREBINGER avec la méthode manganimétrique. Voici les résultats que nous avons obtenus:

Prise de sérum	Méthode gravimétrique de STREBINGER. Eau de lavage: 4 cc. oxal. Ca, 1 cc. H_2O	Méthode manganimétrique par minéralisation	Par précipitation directe
3 cc.	108 mgr./lit.	109 mgr./lit.	
	111 » »		
2 »	115 » »	108 » »	
	116 » »	115 » »	
2 »	98,7 » »	99,4 » »	101,6 mgr./lit.

La méthode gravimétrique de dosage du calcium comme oxalate avec une molécule d'eau est donc applicable au dosage du calcium dans le sérum sanguin. La quantité de sérum nécessaire (2 à 3 cc.) n'est pas plus considérable que pour les méthodes volumétriques, mais la minéralisation est indispensable. L'inconvénient de cette méthode, au point de vue clinique, est d'être beaucoup trop longue et de nécessiter une microbalance.

Cependant, nous avons pensé qu'il était intéressant d'étudier ces microméthodes gravimétriques et de voir si elles pouvaient s'appliquer aux dosages biologiques. Dans certains cas d'hypo- ou d'hypercalcémie très marquées, un dosage gravimétrique peut fournir un contrôle précieux des méthodes volumétriques.

CONCLUSION.

Le dosage du calcium dans le sérum sanguin a donné lieu à une littérature très abondante; il est assez délicat.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de cette étude nous ont amené à la conclusion suivante:

Vu la fixité étonnante de la calcémie, le dosage du calcium sanguin doit être aussi rigoureux que possible.

Voici la méthode que nous préconisons et dont nous allons rappeler les détails techniques:

Méthode: Le sérum (2 cc.) est évaporé à sec dans une capsule de platine, puis calciné, doucement d'abord, sur un bec Teclu, jusqu'à obtention de cendres blanches. On reprend par deux gouttes d'acide chlorhydrique concentré, 2 à 3 cc. d'eau distillée et on transvase dans un microbecher en rinçant soigneusement la capsule; après avoir ajouté une goutte de rouge de méthyle, on rend alcalin avec de l'ammoniaque concentré, puis on acidule avec de l'acide acétique à 4% jusqu'à coloration rose (pH = 5).

Le microbecher est porté au bain-marie bouillant et on ajoute goutte à goutte 0,5 cc. d'une solution saturée d'oxalate d'ammonium; on laisse reposer une heure, puis on filtre avec la baguette microfiltrante garnie d'amiante. On lave 3 fois avec 2 cc. d'ammoniaque à 2%; l'aspiration ne doit pas être trop rapide, ce qui entraînerait un lavage incomplet; la filtration et le lavage durent de dix minutes à un quart d'heure.

On met ensuite dans le microbecher 5 cc. d'acide sulfurique à 20%, on porte au bain-marie à 70° et on titre avec du permanganate de potassium N/100 jusqu'à légère coloration rose persistant une minute au bain-marie à 70°. On soustrait 0.01 cc. du volume de permanganate employé; cette correction est faite à cause de l'amiante qui absorbe légèrement la coloration rose. Comme le dosage est effectué sur 2 cc. de sérum, si la solution de permanganate est exacte, le nombre de cc. employés multiplié par 100 donne directement la teneur en calcium exprimée en milligrammes par litre de sérum.

Ex.: Volume de permanganate employé = 0,98 cc.

Teneur en calcium du sérum = 98 mgr./lit.

Quant aux méthodes gravimétriques, comme nous l'avons du reste déjà dit, elles sont peut-être plus précises que les méthodes volumétriques, mais d'une application difficile pour un laboratoire qui n'est pas spécialisé dans les microdosages de précision.

Detection of Enzymes by "Spot" Tests.

By

B. N. Sastri and **M. Sreenivasaya.**

Department of Biochemistry, Indian Institute of Science, Bangalore.

(Eingelangt am 12. Juni 1933.)

The detection and characterisation of enzymes, offer considerable difficulties especially when the biological fluids are coloured, or, are available in microquantities. A rapid and yet simple method[1] which is now developed has successfully been employed for a study of the enzyme make-up of plant saps and insect body fluids. Such studies are useful as a preliminary to an intensive study of enzymes in plant or animal organisms. This method can elegantly be employed not only for determining the distribution of a particular enzyme in various parts of an organism but also for surveying the occurence of enzymes in nature.

The method. The more common enzymes can be roughly grouped under three classes (1) those that bring about colour changes during the reaction, e. g., the oxidases and the peroxidases, (2) those which alter the reaction (P_H) of the mixture, e. g., esterases and urease and (3) those that release a reducing sugar on hydrolysis, e. g., the carbohydrases and glucosidases. Certain glucosides like indican and arbutin, however, on hydrolysis, give rise to chromogenic aglucones, which on suitable treatment yield specific colour reactions. It is therefore clear (Table I) that, with a large number of enzymes, the changes accompanying their action can be detected by simple qualitative tests.

The method consists in mixing on a strip of fat-free filter paper (3 inches $\times$ ½ inch) a drop of the substrate solution, and a drop of the fluid under examination and allowing the filter paper, along with the necessary controls, to remain under a humidified bell-jar for 30—60 min. The drop on the filter paper is subsequently examined for the reaction products with appropriate reagents. Where a reducing sugar is released, Fehling's test is employed, a jet of stream being directed on to the spot to facilitate reduction. A brick red or orange colour indicates the presence of the enzyme.

[1] Current Science, **1**, 9 (1932).

Table I.

Enzyme	Substrate	Reaction	Remarks
Diastase	0,5% soluble starch	Fehling's	Brick red or orange colour
Inulase	0,5% Inulin	Fehling's	Brick red or orange colour
Invertase	0,5% Cane sugar	Fehling's	Brick red or orange colour
Emulsin	0,5% Salicin	Fehling's	Brick red or orange colour
Emulsin	0,5% Indican	Treath with alkali and expose to air	Blue colour
Lipase	Olive oil emulsin 0,2%	Methyl red	Red
Butyrase	Ethyl acetate water emulsin 0,2%	Methyl red	Red
Urease	1% Urea	Phenolphthalein	Pink
Phenolases	1% Tincture guiacum	—	Blue colour
Tyrosinase	Tyrosine	—	Brown

Amylase and urease. In the case of amylase and urease, a modified drop method has, often, been found convenient. A glazed porcelain slate with a number of depressions on the surface is taken, and a drop of 0,5% soluble starch and a drop of the fluid under examination, are mixed in the hollow, which can if required be closed with a greased cover slip. A series of such drop mixtures can be made and the colour reaction with iodine examined from time to time. Similarly in the case of urease, phenolphthalein can be employed to detect the presence of the enzyme.

Summary.

A simple method for the detection and characterisation of enzymes in microquantities of biological fluids, is described. Its applications in determining the enzyme make-up of tissue fluids and extracts and in surveying the distribution of enzymes in nature are indicated.

The Determination of Iodine in Organic Compounds.

By

Joseph L. Goldberg.

(From the Department of Biological Chemistry, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York City.)

(Eingelangt am 29. Juli 1933.)

The number of variations of the Winkler[1] method for determining iodine attests the difficulties investigators have experienced with this determination. The methods employed may, in general, be classified into two groups: those in which the excess oxidant is removed by (a) physical means, and (b) chemical means.

In the first group the excess oxidant (Br_2 or Cl_2) is removed by boiling, or by passing a current of steam through the solution. In the second, salicylic acid, formaldehyde, formic acid or phenol have been employed. A number of methods employ a combination of boiling and chemical means.

As Schulek[2] and others[3] have shown, the oxidation of iodine to iodate by bromine

$$I_2 + 5\,Br_2 + 6\,H_2O = 2\,IO_3^- + 12\,H^+ + 10\,Br^-$$

is reversible. In the presence of excess bromine and a low concentration of H-ion, the oxidation to iodate is quantitative. However, at higher temperatures, and particularly at the boiling-point, the

[1] L. W. Winkler, Ztschr. analyt. Chem., **39**, 85 (1900); Ztschr. angew. Chem., **281**, 496 (1915).

[2] E. Schulek, Ztschr. analyt. Chem., **66**, 161 (1925).

[3] S. Bugarszky, Ztschr. anorgan. Chem., **10**, 387 (1895).
E. C. Kendall, J. Biol. Chem., **43**, 149 (1920).

reaction reverses after the removal of the excess bromine. The iodine and bromine, products of the reverse reaction, are boiled out and a loss of iodine results.

The problem in the WINKLER method and its modifications is to remove the excess oxidant without reversing the reaction or otherwise decomposing the iodate. The difficulties etperienced by investigators may be attributed to two related causes:

1. poorly defined experimental conditions,
2. failure to take into account the equilibria involved.

In those methods which employ boiling, the boiling must be carried on only long enough to remove excess oxidant, and must be stopped before the reaction reverses. Procedures which specify heating for a definite time over a free flame or on a sand-bath are not easily reproducible. Variations in the rate of heating may result in the incomplete elimination of excess oxidant if the boiling has been insufficient, or in the reversal of the reaction if it has been more than sufficient.

Likewise, LEIPERT's[4] direction to pass a "lively" current of steam through the solution is too vague to yield easily reproducible results. Attempts to use the LEIPERT procedure in this laboratory have been disappointing. The results with solutions of known iodine content (iodine as KI) were low. The loss of iodine varied directly with the acidity and with the rate at which steam was passed through the solution. That the loss was due to a reversal of the reaction is shown by the following experiment.

Solutions (approximating equilibrium conditions in equation 1) were prepared to contain 5 moles of KBr to every mole of KIO_3, i. e., 5,648 mg. KIO_3 and 15,70 mg. KBr in a total volume of 55 cc. (vide LEIPERT). These were acidified as indicated in column 1 of the table and a "lively" current of steam was passed through each solution. The time taken for the steam to raise the temperature of the solution to the boiling-point is recorded in column 2 in order to give an approximate idea of the rate of steaming. The duration of the steaming after the solution had come to a boil is

[4] T. LEIPERT, PREGL-Festschrift, Mikrochemie 1929, p. 266.

indicated in column 3 of the table. The solutions were cooled, 1 gram of KI added to each, and the liberated iodine titrated with $Na_2S_2O_3$.

1 n-H_2SO_4 added	Time to set boiling	Duration of boiling	0,01981 n-S_2O_3= found	calc.	Loss of Iodine
0,2 cc.	4 minutes	7 minutes	7,64 cc.	7,99 cc.	4,4 %
0,2 cc.	3 „	7 „	7,49 cc.	7,99 cc.	6,3 %
0,2 cc.	3 „	4 „	7,77 cc.	7,99 cc.	2,8 %
0,2 cc.	3 „	4 „	7,76 cc.	7,99 cc.	2,9 %
0,1 cc.	3 „	7 „	7,75 cc.	7,99 cc.	3,0 %
0,1 cc.	3 „	7 „	7,78 cc.	7,99 cc.	2,6 %
0,1 cc.	3 „	4 „	7,83 cc.	7,99 cc.	2,0 %
0,1 cc.	3 „	4 „	7,84 cc.	7,99 cc.	1,9 %
Controls.					
0,2 cc.	not heated		7,99 cc.	7,99 cc.	0,0 %
0,2 cc.	„ „		7,99 cc.	7,99 cc.	0,0 %

Since, in the LEIPERT procedure, the steaming first removes excess bromine, the time necessary for this removal was determined. A solution of 2 cc. of saturated brominewater + 55 cc. of water came to a boil in 3½ minutes, and became colorless after 2 minutes of boiling. The additional 5 minutes of boiling required by the LEIPERT procedure, or the additional two minutes which would be required if PREGL's directions[5] were followed, would serve, therefore, only to reverse the reaction. The losses recorded in the table are of the same order as those found in attempting to oxidize standard KI solutions under similar conditions of acidity and rate of steaming.

In those methods employing a combination of heating and chemical means, the precaution must be taken to cool the solution before adding the reagent for removing excess bromine. In a number of experiments this precaution was neglected, and the loss of iodine amounted to as much as 1%. This can be explained by assuming that the excess reagent also removes the bromine formed by the reverse reaction, with the consequent loss of iodine.

[5] F. PREGL, Die quantitative organische Mikroanalyse, third edition, p. 150.

Of the chemical agents for removing excess oxidant, salicylic acid yielded poor results, the insolubility of this acid necessitating the use of a large volume of solution. Attempts to use aniline sulfate were disappointing as the turbidity caused by the brominated amine made detection of the end-point difficult. Formic acid and formaldehyde were not tried. Phenol yielded excellent results without requiring excessive care in regulating the experimental conditions. The procedure used is, essentially, that of SCHULEK[1].

Procedure.

The application of this method to organic iodine compounds requires the conversion of the organically combined halogen to ionic halogen. This is carried out according to PREGL[6], omitting the use of bisulfite. The carbonate solution containing the absorbed iodine is washed into an Erlenmeyer flask, neutralized (methyl orange) with 1 n-H_2SO_4, and 0,1 cc. acid in excess added. The acidified solution should not exceed 75 cc. in volume. One cc. of saturated bromine-water is then added, the solution shaken and allowed to stand for 2 minutes. Excess bromine is removed by the addition of 1 cc. of a 5% solution of phenol (quinone-free). After shaking and allowing to stand for 2—3 minutes, a solution of 1 gram of KI (iodate-free) in a few cc. of water is added, and the liberated iodine titrated with thiosulfate. The iodine found is equal to six times that present in the original sample.

This procedure gives excellent results provided the following precautions are heeded:

1. The acidity of the solution to which the bromine is added should be kept low. The volume of excess acid given above may be exceeded by 0,1 to 0,2 cc., but more than this is inadvisable.

2. The phenol should be added in one portion (not dropwise). The dropwise addition of phenol may yield a turbid suspension of tri-bromo phenol and tri-bromo phenol bromide. The latter liberates iodine from KI and yields, consequently, results that are too high. If the phenol has been added properly the solution be-

[6] F. PREGL, Die quantitative organische Mikroanalyse, third edition, p. 144.

comes colorless and remains clear. These precautions are similar to those recommended by LUNDE, CLOSS and BÖE[7] for a semi-micro modification of another SCHULEK procedure[8].

One cc. of saturated bromine-water provides sufficient bromine to oxidize 4 milligrams of iodine[9]. One cc. of phenol provides a sufficient excess of this reagent to quantitatively remove excess oxidant without yielding a turbid solution. Blank determinations gave no starch-iodine color within 15 minutes (only a very faint color thereafter), whereas the titration is usually completed within 5 minutes.

Weight of sample	Thiosulfate required		% Iodine		Error parts per 1000
	cc.	normality	found	calculated	
Iodoacetic acid					
3,475 mg.	5,65	0,01982	68,17	68,26	— 1,3
5,346 mg.	8,70	0,01980	68,17		— 1,3
5,812 mg.	9,47	0,01980	68,25		— 0,2
β-Iodopropionic acid					
5,665 mg.	8,59	0,01980	63,52	63,47	+ 0,8
6,131 mg.	9,29	0,01980	63,47		— 0,0
5,997 mg.	9,09	0,01980	63,49		+ 0,3
Iodoform					
3,974 mg.	9,16	0,01980	96,55	96,70	— 1,6
3,761 mg.	8,67	0,01980	96,56		— 1,4
4,000 mg.	9,24	0,01980	96,76		+ 0,6
Iodohippuric acid					
6,138 mg.	6,10	0,01982	41,67	41,62	+ 1,2
5,623 mg.	5,59	0,01982	41,68		+ 1,4
8,340 mg.	8.28	0,01979	41,57		— 1,2
Iodobenzoic acid[10]					
7,406 mg.	9,04	0,01978	51,08	51,19	— 2,1
7,377 mg.	9,00	0,01978	51,05		— 2,7
7,867 mg.	9,60	0,01979	51,09		— 2,0

[10] Carius determinations on this material gave 51,06 %, 51,10 %

[7] G. LUNDE, K. CLOSS and J. BÖE. PREGL-Festschrift, Mikrochemie 1929 p. 282.

[8] E. SCHULEK and A. STASIAK, Pharmaz. Zentralhalle, **69**, 113 (1928); **69**, 513 (1928).

[9] The excess bromine is sufficient to oxidize any nitrite that may be formed by the incomplete oxidation of nitrogenous compounds. Blanks containing three milligrams of NO_2^- gave no test for nitrite after treatment with bromine water.

Although the use of 0,01 N thiosulfate is customary in microanalysis, experience in this laboratory favors the use of 0,02 N thiosulfate. While the former decomposes rapidly and must be restandardized from day to day, the latter (containing a small amount of alkali as preservative) has been found to maintain a constant titer for three weeks.

Some typical analyses are appended. Results are generally accurate within $\pm$ 2 parts per thousand.

My thanks are due Dr. O. WINTERSTEINER and Dr. G. L. FOSTER for their helpful suggestions.

Eine neue Mikromethode zum Nachweis von Monosen in der Anwesenheit von reduzierenden Biosen.

Von

Henry Tauber.

Aus dem Institut für Physiologie und Physiologische Chemie des New York Homeopathic Medical College und Flower Hospital, New York.

(Eingelangt am 28. August 1933.)

Die sogenannte Barfoed'sche Lösung, die aus Kupferacetat und Essigsäure besteht, wurde ursprünglich zum qualitativen Nachweis von Monosen neben Biosen empfohlen, da sie nur von ersten reduziert wird. Man hat versucht, durch Variation der Menge ihrer Bestandteile sowie der Zeitdauer des Erhitzens ihre Wirksamkeit zu verbessern, doch ist dies nicht in befriedigender Weise gelungen[1–3]. Die größten Schwierigkeiten waren der Flüchtigkeit der Essigsäure zuzuschreiben[4].

Der prinzipielle Unterschied dieser nachstehenden neuen Methode ist, daß die flüchtige Essigsäure durch eine nichtflüchtige Säure (Milchsäure) ersetzt wird und daß das durch die Oxydation der Monosen entstehende Cu_2O mit einer Molybdatlösung versetzt wird, worauf eine blaue Farbe entsteht, die der angewandten Monose proportional ist[5]. Im Gegensatz zu den älteren Modifikationen ist die neue Lösung unbegrenzt lange haltbar. Das verbesserte Reagens kann in der quantitativen Analyse[5], für glucosidase Reaktionen, Blutanalyse[6] und unter bestimmten Bedingungen auch in der Urinanalyse[6] und, wie nachstehend angeführt wird, für den Mikronachweis (in einem Tropfen) von Monosen in der Anwesenheit von Biosen angewendet werden.

Lösungen.

1. Neues Kupfer-Monose-Reagens. 24 g Kupferacetat (Merck, chemisch rein) werden in 450 ccm Wasser bei

[1] I. C Blake, Journ. Amer. chem. Soc., **38**, 1245 (1916).
[2] H. McGuigan, Amer. Journ. Physiol., **19**, 175 (1907).
[3] A. P. Mathews und McGuigan, Amer. Journ. Physiol., **19**, 199 (1907).
[4] Sieben, Z. Ver. Rübenzucker Ind., **34**, 887 (1881).
[5] H. Tauber und I. S. Kleiner, J. Biol. Chem., **99**, 249 (1932).
[6] I. S. Kleiner und H. Tauber, J. Biol. Chem., **100**, 749 (1933).

Siedehitze aufgelöst; ein hierbei entstehender Niederschlag soll nicht abfiltriert werden. Zur siedenden Lösung werden 25 ccm einer 8,5%igen Milchsäure gegeben. Beim Schütteln und kurzem Kochen geht fast der ganze Niederschlag in Lösung. Nach dem Erkalten wird filtriert und auf 500 ccm verdünnt. Die so erhaltene Lösung ist klar und unbegrenzt lange haltbar.

2. Molybdatlösung. Diese Lösung ist dieselbe wie eine kürzlich von BENEDICT[7] beschriebene. 150 g ammoniakfreie, chemisch reine Molybdänsäure und 75 g chemisch reines Natriumcarbonat (kristallwasserfrei) werden in einem Erlenmeyer-Kolben mit kleinen Mengen Wasser vermengt und geschüttelt (man verwende insgesamt 500 ccm); man erhitzt, bis fast die ganze Molybdänsäure in Lösung geht. Von dem kleinen, unlöslichen Rückstand wird abfiltriert, 300 ccm 85%ige Phosphorsäure zum Filtrat gegeben und nach dem Erkalten zu 1000 ccm verdünnt.

Nachweis.

Man gebe in eine Mikroeprouvette einen Tropfen (0,05 ccm) der neutralen Monose-Biose-Lösung. Die untersuchende Lösung soll so verdünnt werden, daß die Gesamtreduktion[8] (in Glucoseäquivalent), die durch eine beliebige kolorimetrische Methode, wie die von BENEDICT angegebene[7], oder durch ein volumetrisches Verfahren, wie das HAGEDORN-JENSEN'sche bestimmt werden kann, nicht mehr als 1,25 mg pro Kubikzentimeter haben soll und dessen Gesamtreduktion (in Glucoseäquivalent) nicht weniger als 0,05 mg pro Kubikzentimeter ist, wenn die Mischung Glucose und Lactose enthält. Enthält die Lösung Glucose und Maltose, darf die Gesamtreduktion in Glucoseäquivalent nicht über 0,50 mg pro Kubikzentimeter sein. Sucrose kann bis 2,5 mg in der Lösung pro Kubikzentimeter sein, ohne zu stören.

In eine zweite Eprouvette gebe man einen Tropfen (0,05 ccm) destilliertes Wasser zur Kontrolle. Zu je der zwei Eprouvetten gibt man einen Tropfen des neuen Monosereagens, stellt beide Proben 8 Minuten in kochendes Wasser und läßt 2 Minuten er-

[7] S. R. BENEDICT, J. Biol. Chem., 92, 141 (1931).

[8] Die Gesamtreduktion darf die angegebene Menge nicht überschreiten, da dann die Biosen auch reduzieren. Eine zu konzentrierte Bioselösung würde also auch das neue Monosereagens reduzieren, genau so wie verdünnte Monoselösungen.

kalten. Dann gibt man zu beiden Lösungen einen Tropfen der Molybdänlösung und nach 2 Minuten unter Umschütteln 10 Tropfen destilliertes Wasser. Eine blaue Farbe entsteht in Anwesenheit von Monosen; falls nur Biosen vorliegen, haben beide Lösungen die gleiche (hellgrüne) Farbe. Die entstehende Farbe ist proportional der anwesenden, reduzierenden Zucker[8]. Chloride und andere anorganische Salze stören; bis zur 1,5 mg NaCl pro Kubikzentimeter sind ohne Einfluß (siehe auch WELKER[9]).

Die kleinste nachweisbare Menge Glucose oder andere Monose ist 0,0025 mg (in einem Tropfen). Die Anwesenheit von bis zehnmal so viel an Maltose oder 25mal an Lactose in der Monose-Biose-Mischung stört nicht. Sucrose stört auch in größeren Mengen nicht.

Die Anwendung der Benedict'schen Lösung zum Mikronachweis von Zucker im Urin und in anderen Lösungen.

Von

HENRY TAUBER.

Aus dem Institut für Physiologie und Physiologische Chemie des New York Homeopathic Medical College und Flower Hospital, New York.

(Eingelangt am 28. August 1933.)

Die BENEDICT'sche[1] Lösung ist eine modifizierte FEHLING'sche Lösung. Trotzdem sie schon über 20 Jahre in den Vereinigten Staaten in jedem physiologisch-chemischen Laboratorium sowie in jedem Spital und von tausenden Ärzten täglich benützt wird, scheint eine Verwendung dieser Lösung in Europa nicht zu erfolgen. Im Gegensatz zur FEHLING'schen Lösung wird die BENEDICT'sche Lösung von Chloroform, Ammonsalzen, Harnsäure, Creatinin oder saurem Urin nicht angegriffen; auch enthält sie alle Bestandteile in einem Reagens und ist unbegrenzt lange haltbar.

Wie in folgendem beschrieben, eignet sich diese Lösung vorzüglich für den Mikronachweis von Glucose im Urin usw., womit eine Ersparnis an Reagens und Zeit verbunden ist.

[9] W. H. WELKER, Journ. Amer. chem. Soc., **37**, 2227 (1915).

[1] S. R. BENEDICT, J. Biol. Chem., **5**, 485 (1909); J. Am. Med. Assocn., **57**, 1193 (1911).

Reagens.

Kupfersulfat (kristallisiert) 17,3 g,
Natriumcitrat 173,0 g,
Natriumcarbonat (kristallwasserfrei) 100 g (oder 200 g kristallisiert).

Das Natriumcitrat und Natriumcarbonat wird in 750 ccm Wasser gelöst und filtriert. Das in Wasser gelöste Kupfersulfat wird in die Carbonat-Citrat-Lösung gegossen, gemischt und auf 1 Liter mit Wasser verdünnt.

Nachweis.

Ein Tropfen (0.05 ccm) des klaren oder filtrierten Urins oder ein Tropfen der untersuchenden Lösung wird in eine Mikroeprouvette mit 0,5 ccm der BENEDICT'schen Lösung versetzt und 2 Minuten in ein Gefäß mit kochendem Wasser gegeben. (Für eine größere Anzahl Untersuchungen sind serologische Eprouvettenbehälter sehr praktisch, da man diese direkt in das kochende Wasser stellen und so mehrere Bestimmungen gleichzeitig durchführen kann.) Nach Erkalten erscheint bei Anwesenheit von Glucose ein ziegelroter, gelber oder grüner Niederschlag. Die Farbe ist von der Quantität der vorhandenen Glucose (bezw. Cu_2O) abhängig. Wenn die Lösung mehr als 0,2% Glucose enthält, entwickelt sich der Niederschlag sehr rasch. Bei Abwesenheit von Glucose oder wenn nur „normale Spuren" im Urin vorhanden sind, erscheint die Lösung unverändert. Die BENEDICT'sche Lösung wird auch von Biosen reduziert; bezüglich Differenzierung vgl. H. TAUBER und I. S. KLEINER[2].

Erfassungsgrenze: 0,03 mg in einem Tropfen (0,05 ccm) Lösung. Eine positive BENEDICT'sche Probe zeigt noch 0,1% Glucose an. Eine Störung in der Urinanalyse tritt nur dann ein, wenn Urate vorhanden sind, indem eine schwache Trübung entsteht. Diese Trübung enthält aber kein Kupferoxydul, wenn kein Zucker vorhanden ist.

[2] H. TAUBER und I. S. KLEINER, J. Biol. Chem., **99**, 249 (1932); I. S. KLEINER und H. TAUBER, J. Biol. Chem., **100**, 749 (1933).

Über eine neue Methode der präparativen Mikrochemie.

Von

Joachim Winckelmann.

Berlin-Friedenau.

Aus dem Laboratorium für mikrochemische Arbeitsmethoden.

(Eingelangt am 4. September 1933.)

Es sind schon viele Methoden angegeben worden, wie man Niederschläge zu Dauerpräparaten umarbeiten kann. In dem älteren Buche von Behrens über mikrochemische Technik finden wir z. B. ausführliche Angaben über die Herstellung von Dauerpräparaten. Die neueren Werke von Emich und anderen geben nur kürzere Anweisungen oder verweisen auf die ältere Literatur.

Aber nur Behrens weist eigentlich ausführlich genug auf die großen Schwierigkeiten hin, die dadurch entstehen, daß man im allgemeinen bei mikrochemischen Reaktionen einen Überschuß an Reagens benutzen muß, sowie gewöhnlich noch andere Zusätze, die nachher beim Eintrocknen des Präparates auskristallisieren und dicke Krusten am Rande des Präparates bilden oder die charakteristischen Kristalle der nachzuweisenden Substanzen völlig überdecken. Will man nun das Reagens durch Auswaschen beseitigen, so schwemmt man den größten Teil der charakteristischen Kristalle der nachzuweisenden Substanzen ebenfalls mit fort oder diese fallen so durcheinander, daß die Schönheit des ursprünglichen Niederschlages völlig zerstört ist.

Ferner bilden sich stets bei mikrochemischen Reaktionen die Kristalle in den verschiedensten Formen, die nicht der Idealform entsprechen, sondern Verwachsungen, Durchdringungen, Halbformen und viele andere Nebenformen bilden, die aber für den Kenner ebenso wertvoll sind wie die ideale Hauptform, die oft gar

nicht auftritt. Derartige Kristalle liegen, solange das Präparat noch nicht durcheinandergeschüttelt worden ist, nebeneinander und geben ein übersichtliches und charakteristisches Bild aller Erscheinungen. In dem endgültigen Dauerpräparat aber ist zumeist leider sehr wenig von der ursprünglichen Schönheit und Übersichtlichkeit zu merken, was zweifellos ein Nachteil ist.

Ich habe im Laufe der Zeit eine ganze Anzahl von Methoden ausprobiert, die diesem Übelstande abhelfen sollen. Von diesen helfen eine Anzahl in einigen Fällen gut, in anderen wieder nicht, denn es kommt noch eine Reihe von Forderungen hinzu, die erfüllt werden müssen, um eine solche Methode möglichst allgemein brauchbar zu machen.

1. Eine gute Methode zur Herstellung von Dauerpräparaten muß handlich und sehr einfach ausführbar sein.

2. Die hierzu angewandten Mittel müssen möglichst einfach und billig sein.

3. Die Methode muß sich leicht nach dem jeweilig vorliegenden Falle abändern lassen und so allgemein sein, daß sie mit ganz wenigen Ausnahmen für jeden in Frage kommenden Fall brauchbar ist, also z. B. auch für den mikrochemischen Nachweis in Pflanzenschnitten und dergleichen. Gerade in der gegenwärtigen Zeit hat eine Methode wenig Erfolg, zu der teure Reagenzien benutzt werden, oder große Vorrichtungen, wie Einbettungsöfen, Bäder für konstante Temperaturen oder andere komplizierte mechanische Apparate. Auch darf die Zeit, die angewandt werden muß, nur kurz sein; am besten wäre es, wenn man sofort, sobald man bei der mikrochemischen Arbeit ein gutes Präparat gemacht hat, das man für spätere Zwecke aufheben will, es so behandeln könnte, daß es als gutes Dauerpräparat noch am Ende des gleichen Arbeitsganges fortgelegt werden könnte. Das ist nun nach der hier beschriebenen Methode möglich.

Bevor ihre Anwendung erläutert wird, seien kurz die wenigen in Frage kommenden Reagenzien und Instrumente angeführt.

Objektträger. Das beliebte englische Format 76×22 ist für den vorliegenden Zweck zu schmal. Das geringste in Betracht kommende Maß ist das Leipziger Format 70×35 oder besser noch 75×40. Mit alten Photoplatten von 6×9 kommt man auch gut aus. Für die meisten Fälle reichen Vergrößerungen bis 300fach.

Beim Beginn einer Reaktion beobachte man nicht mit Vergrößerungen über 80fach, um ein möglichst großes Gesichtsfeld überblicken zu können; nur für ganz besondere Zwecke wird man in einigen Fällen zu Vergrößerungen bis zu 750fach greifen müssen.

Eine gute Lupe (10- bis 16mal vergrößernd) leistet, besonders wenn man ein passendes Stativ dafür besitzt, bei der Herstellung der Präparate gute Dienste.

Deckgläser. Zur Gewinnung von Kristallen durch langsames Verdunsten braucht man einige größere Deckgläser von etwa 20×30 mm.

Glasdosen mit eingeschliffenem Deckel (Wägegläschen). In diesen hebt man z. B. Glyzeringelatine auf, von der man eine kleine Menge den käuflichen Röhrchen entnommen hat, um nicht immer wieder das Originalröhrchen öffnen und erwärmen zu müssen. Man kann auch unter Verwendung größerer Substanzmengen Reaktionen, die sich langsam abspielen, z. B. chemische Reaktionen in Gallerten, in ihnen vornehmen und direkt unter dem Mikroskop beobachten. Der staubfreie Verschluß durch den eingeschliffenen Deckel ist für solche Reaktionen, die über eine längere Zeit beobachtet werden können, sehr wünschenswert. Es gibt auch Dosen aus dickerem Glas, mit überfallendem oder aufgeschliffenem Deckel, bei denen jedoch eine direkte Beobachtung unter dem Mikroskop wegen der Dickwandigkeit des Glases schwieriger ist.

Kapillaren. Diese stellt man sich durch Ausziehen von dünnwandigem Glasrohr in verschiedenen Stärken her. Man kann sie vielseitig benutzen zum Absaugen kleiner Flüssigkeitsmengen, aber auch zur Abgabe winziger Tröpfchen. Hierdurch hat man die Möglichkeit, auf eine getrocknete ausgebreitete Substanz sehr viele Reaktionen nebeneinander ausführen zu können. Für ähnliche Zwecke verwendet man auch dünne Glas- und Porzellanstäbchen von etwa 2 mm Durchmesser. Die Kapillaren werden nach Gebrauch nicht gereinigt, sondern fortgeworfen.

Ebene Platte. Viele mikrochemische Reaktionen brauchen eine gewisse Zeit für ihren vollständigen Ablauf. Bei der Ausführung von Reaktionen auf einem Objektträger ist deshalb dessen ebene Lagerung erforderlich, um ein Abrinnen zu verhüten. Am besten hierfür geeignet ist eine größere Sperrholzplatte oder noch besser eine Spiegelglasplatte, die drei Schrauben mit feinem Ge-

winde trägt. Die flachen Muttern für diese Schrauben sind an der Platte befestigt. Man braucht eine Größe, die das Auflegen von mindestens 12 bis 20 Objektträgern gestattet, also zirka 20 × × 30 cm. Über das Ganze wird ein Karton oder Holzdeckel gestürzt, damit die Präparate nicht verstauben. Bei der Spiegelglasplatte können die Muttern mit Siegellack befestigt werden. Die Platte wird mittels der drei Schrauben und einer kleinen Wasserwaage vollkommen waagrecht aufgestellt.

Man sieht also, daß man mit äußerst geringen Mitteln auskommt.

Das Prinzip der im nachfolgenden ausführlich beschriebenen Methode besteht darin, daß die in bekannter Weise auf einem Objektträger erhaltenen Mikrokristalle mit einem Medium fixiert werden, das eine Weiterbehandlung des Präparates (Auswaschen und dergleichen) gestattet, ohne daß die Testkristalle in ihrer Lage oder ihrer äußeren Form verändert werden.

Versuche, kristallinische Niederschläge auf dem Objektträger in ähnlicher Weise mittels Gelatine, Eiweiß oder dergleichen zu fixieren, wie dieses bei Mikrotomschnitten geschieht, ergaben keine universell brauchbaren Methoden.

Auf der Suche nach dem geeigneten Medium kam ich schließlich zur Verwendung von Kollodium. Aus diesem Stoffe lassen sich nach einem Verfahren von OSTWALD ausgezeichnete halbdurchlässige Membranen herstellen, die OSTWALD auch als Schwammschichten bezeichnet und die zur Filtration und Trennung von Kolloiden und Kristalloiden benutzt werden.

Es mußte also möglich sein, durch diese Medien hindurch auch Kristalle von Mutterlaugen usw. zu befreien oder auf dem umgekehrten Wege durch solche Schwammschichten hindurch Lösungen auf Substanzen in fester Form wirken zu lassen. Nach mannigfacher Schwierigkeit gelang es, zwei Methoden zu finden, die einwandfrei zum Ziele führen, wenn man die Reihenfolge der auszuführenden Handgriffe genau einhält.

1. Methode (diese Methode ohne Auswertung zur Herstellung von Dauerpräparaten beschreibt MARTINI in dieser Zeitschrift[1]:

A. Aufbringen eines Tropfens der zu untersuchenden Lösung auf einen Objektträger.

[1] Mikrochemie, VII, 236 (1929).

B. Eintrocknen über kleiner Flamme und völlig abkühlen lassen.

C. Aufbringen einer Kollodiumschicht.

D. Abdunsten des Lösungsmittels ohne Anwendung künstlicher Erwärmung.

E. Aufbringen des Reagens auf die Kollodiumschicht und Beobachten des entstehenden Niederschlages.

F. Auswaschen des Reagenzrestes.

G. Nachbehandlung.

2. Methode.

A. Aufbringen eines Tropfens der zu untersuchenden Lösung auf den Objektträger.

B. Erzeugung eines charakteristischen Niederschlages nach den üblichen Methoden der Mikrochemie.

C. Eintrocknen bei mäßiger Erwärmung und völliges Abkühlenlassen.

D. Überschichtung mit Kollodiumlösung.

E. Abdunsten des Lösungsmittels bis zum Entstehen der Schwammschicht.

F. Auswaschen des Präparates durch diese Schwammschicht hindurch.

G. Nachbehandlung.

Es sind nun einige Handgriffe zu beachten, von denen das Gelingen der ganzen Methode abhängt.

1. Die verwendeten Objektträger müssen sehr sauber sein. Am besten läßt man sie vor der Benutzung einige Zeit in verdünnter Kalilauge, Natronlauge oder mäßig verdünnter Sodalösung, Persil- oder Seifenpulverlösung liegen. Dann reinigt man sie durch Abspülen mit viel heißem Wasser und reibt sie trocken. Vor der Benutzung werden sie noch einmal unter Hinzufügung von einigen Tropfen Alkohol gut abgerieben.

2. Als Kollodiumlösung eignet sich die offizielle Lösung, die man in Apotheken und Drogenhandlungen erhält. Sie ist 6%ig. Da sie etwas reichlich dickflüssig ist, kann man ihr noch ein Zehntel des Volumens an Äther, gemischt mit Alkohol, oder nur Alkohol zusetzen. Sie muß, auf einen Objektträger gebracht, gleichmäßig fließen und darf nicht sofort erstarren. Ich habe auch Versuche mit verdünnteren Kollodiumlösungen gemacht, die sich gleichfalls als

brauchbar erwiesen, doch haben stärkere Lösungen den Vorteil, daß größere Kristallaggregate besser zugedeckt werden.

3. Der Objektträger muß nach dem Erwärmen sehr gut gekühlt sein, sonst entstehen in der Kollodiumlösung reichlich Blasen, während auf gut gekühlten Objektträgern kaum eine Blase zu entstehen braucht.

4. Es darf niemals der kleinste Tropfen Flüssigkeit über den Rand des Kollodiums laufen. An dieser Stelle würde sich die Kollodiumschicht sofort oder später vom Glase lösen und das Präparat verderben. Dieses ist der allerwichtigste Punkt der ganzen Methode. Es soll stets der ganze äußere Rand der Kollodiumschicht in der Breite von einigen Millimetern von allen Einflüssen unberührt bleiben.

Ich habe eine Anzahl von Versuchen angestellt, um den Rand der Kollodiumschicht festzukleben, z. B. mit Dammarlack, Kanadabalsam, Kautschuklösung, Eiweiß u. a. m. Alle diese Methoden helfen etwas, aber das beste ist es, den Versuch so einzurichten, daß der Rand eben unberührt bleibt, was bei einiger Aufmerksamkeit leicht möglich ist. Man hat beim Aufgießen der Kollodiumschicht nur dafür zu sorgen, daß sie in der Mitte keinen Buckel bildet, sondern eher eine Randwulst. Dieses erreicht man dadurch, daß man nicht mit zu dickflüssigem Kollodium gießt und das Deckglas nach dem Aufsetzen einer genügenden Menge Kollodium nach allen Seiten neigt, so daß sich das Kollodium recht weit ausbreitet; ein Überschuß kann an einer Ecke abtropfen gelassen werden.

5. Bei der ersten Methode müssen außerdem die Reagenzien in kleinen Tropfen verschiedener Konzentration aufgebracht werden. Unter einem Tropfen werden dann besonders gute Kristalle entstehen.

Bei vielen mikrochemischen Reaktionen werden mehrere Reagenzien und Zusätze verwendet, auch entstehen die besten Kristalle gerade dadurch, daß in dem Tropfen ein Konzentrationsgefälle entsteht, also die Konzentration der einzelnen Lösungen an verschiedenen Stellen verschieden hoch ist, wodurch immer in besonderen Zonen besonders gute und charakteristische Kristalle herangebildet werden. Dieses zu erreichen, bereitet nach der ersten Methode oft erhebliche Schwierigkeiten. Da sie sich überdies von der Methode 2

nur durch die Reihenfolge der Handgriffe unterscheidet und letztere in den meisten Fällen bessere Übersichtspräparate liefert, soll hier nur die zweite Methode ausführlich beschrieben werden.

Als Beispiel sei hier die Bildung von Silberchromat gewählt, da die entstehenden Bilder hierbei sehr instruktiv sind.

Praktische Ausführung der Kollodium-Methode.

Man bringt auf einen wie oben beschriebenen, gut gereinigten Objektträger einen kleinen Tropfen einer 0,05- bis 0,01%igen Lösung von $AgNO_3$. Gleichzeitig bereitet man noch einige Objektträger vor, bei denen der Lösung noch ein wenig freie Salpetersäure, ferner auch Natriumazetat oder Ammoniumazetat oder -karbonat zugesetzt wird. Je nach diesen Zusätzen fällt die Größe und Form der hier entstehenden Kristalle verschieden aus. Allen aber bleibt die charakteristische dunkelrote bis schwarze Farbe des Silberchromats eigentümlich. Der Objektträger befindet sich bereits auf dem Tisch des Mikroskops, der gut waagrecht stehen muß, was sich mit einer kleinen Libelle leicht bewerkstelligen läßt. Nach Einbringen eines winzigen Körnchens $K_2Cr_2O_7$ entstehen sehr bald die charakteristischen Kristalle von Silberchromat, respektive Bichromat. Entstehen sofort zahlreiche winzige oder dickere Kristalle, so enthielt die Lösung zuviel Silber; man hält sich gar nicht weiter damit auf, sondern stellt den Objektträger zur späteren Untersuchung beiseite und wiederholt den Versuch mit einer Silbernitratlösung, die auf das Doppelte verdünnt wird. Diese Regel gilt ganz allgemein. Weniger zu verdünnen, hat bei der ungemeinen Empfindlichkeit der mikrochemischen Reaktionen gar keinen Zweck. Die Verdünnung führt man zweckmäßig so aus, daß man einem Tropfen Silbernitrat auf dem Objektträger einen Tropfen destillierten Wasser hinzufügt. Entstehen beim nächsten Versuch wieder zu dicke oder zu zahlreiche Kristalle, wird die bestehende Lösung noch einmal auf das Doppelte verdünnt. Hat man eine gute Konzentration getroffen, stellt man sich davon eine kleine Vorratsmenge (etwa 10 ccm) für alle weiteren Versuche her. Die Kristalle sollen nicht allzu schnell entstehen. Es bilden sich dann durch die langsame Diffusion besser ausgebildete Kristalle (Abb. 1). Alles ist klar und schön zu sehen, aber eben nur solange man das Präparat unberührt auf dem Tisch des Mikroskops stehenläßt und von der

Flüssigkeit nicht viel verdunstet ist. Läßt man das Präparat langsam eintrocknen, sind bald die Konzentrationen der anderen im Tropfen befindlichen Salze zu groß geworden und sie beginnen sich auszuscheiden. Zuerst einige wenige, dann immer mehr und schließlich bleibt ein Kristallkonglomerat übrig, in dem bei bestem Willen nichts mehr zu erkennen ist. Auch auf dem Präparat Abb. 2 haben sich ganze Flächen mit Kristallen bedeckt. Um von diesen Präparaten nun Dauerpräparate zu machen, müßten die störenden Ausscheidungen aufgelöst und ausgewaschen werden. Man bringt auf das frische Präparat einen Tropfen Wasser und schleppt die Flüssigkeit mit einem an den Rand gelegten Filtrierpapierstreifen ab. Abb. 3 zeigt die Überreste nach der Behandlung. Alles liegt wild durcheinander. Dabei gehören Silberchromatkristalle noch zu den robusten. Man versuche aber einmal, solche Manipulationen mit zarten Nadeln oder Kristallbüscheln zu machen oder mit ganz winzigen Mengen, bei denen sich nur einige wenige Kristalle gebildet haben. Es ist dann unmöglich, ein wirklich gutes Dauerpräparat davon herzustellen. Hier hilft nun vorzüglich die neue Methode. Man verfertigt also noch einmal ein Präparat, so wie es der Konzentration nach am günstigsten ist. Am besten stellt man gleich mehrere her und läßt sie völlig auftrocknen. Hierzu benutzt man die horizontal gestellte Platte. Sie werden mit einem Pappdeckel bedeckt, damit die Präparate nicht vollstauben. Sind sie völlig aufgetrocknet, zeigen sie alle Bilder ähnlich Abb. 2.

Man nimmt jetzt ein Präparat in die Hand, gießt vorsichtig eine nicht zu kleine Menge Kollodium darauf, dreht den Objektträger hin und her und läßt das Kollodium fast über den ganzen Objektträger laufen. Die Schicht soll alle Präparateteile bedecken, aber in der Mitte nicht zu dick sein. Erstarrt sie sofort, dann ist das Kollodium zu dickflüssig und muß mit Äther und Alkohol etwas verdünnt werden. Einen Überfluß kann man in einer Ecke abtropfen lassen. Hat man die Reaktion in einem kleinen, recht flachen Tropfen ausgeführt, ist es leicht, alle Kristalle gut zu bedecken. Die Kollodiumschicht darf in der Mitte auf keinen Fall höher stehen als auf dem Rande. Man läßt nun auftrocknen, bis sich die sogenannte Schwammschicht gebildet hat, was nur wenige Minuten dauert. Die Schicht ist dann noch etwas weich, was man mit dem Fingernagel sehr leicht feststellen kann. Sie hält alle Teile des

Präparats vollkommen fest, läßt aber Flüssigkeiten leicht durch. Nun bringt man mittels einer Tropfpipette oder einer Tropfflasche einige Tropfen Waschflüssigkeit (fast immer destilliertes Wasser) auf dieses Präparat. Bereits in sehr kurzer Zeit beginnen die leicht löslichen Salze sich aufzulösen, was man in unserem Falle an dem Gelbwerden des Tropfens durch gelöstes Kaliumbichromat gut erkennen kann. Mit einer Pipette mit Gummikappe saugt man den Tropfen wieder auf und wiederholt das ganze Verfahren mehrere Male. Es ist nur darauf zu achten, daß der Tropfen auf keiner Seite über die Kollodiumschicht fließt. Nach dem letzten Auswaschen kann man noch mit verdünntem Alkohol nachwaschen. Sehr zweckmäßig ist die Verwendung einer Lupe mit Stativ. Man beobachtet den Vorgang dann unter der Lupe, wobei eine zehnfache Vergrößerung ausreicht, und hat die Hände frei. Natürlich muß auch dieses Stativ völlig waagrecht stehen, damit der Tropfen nicht zur Seite ablaufen kann. Ist das Präparat klar, wird es ohne Anwendung weiterer Mittel an der Luft getrocknet. Ebenso wie Wasser zum Auswaschen kann man natürlich auf das Präparat auch ein anderes gelöstes Reagens bringen, das das Präparat nachträglich beeinflußt. So kann man nachträglich Kristalle oder Schnitte färben usw. Hat man richtig gearbeitet, trocknet die ganze Kollodiumschicht glatt auf, aber auch einige kleine Falten in der Schicht schaden nichts, denn beim Anfertigen eines Dauerpräparats verschwinden sie vollständig.

Eigentlich stellt das Ganze schon jetzt ein fertiges Dauerpräparat dar. Es empfiehlt sich aber, das überflüssige Kollodium an den Rändern fortzuschneiden. Man kann sogar, wenn man will, das kleine Kollodiumhäutchen mit allen Kristallen auf einen anderen Objektträger übertragen. Nötig ist dieses aber nicht. Das nach dem Beschneiden übrigbleibende Mittelstück wird mit einem Tropfen Kanadabalsam bedeckt, der an einem Deckgläschen hängt. Das Deckglas muß aber größer sein als das Kollodiumhäutchen. Es wird dann, wie üblich, beschwert und weiterbehandelt. Oder man läßt auf das Häutchen einen nicht zu kleinen Tropfen Dammarlösung fallen, staubfrei eintrocknen und verschließt später endgültig mit Kanadabalsam und Deckglas. Die Weiterverarbeitung, Umrandung mit Deckglaskitt oder Maskenlack usw. erfolgt nach irgendeiner der vielen Methoden, die den Mikroskopikern ja geläufig sind.

Betrachtet man jetzt das fertige Präparat unter dem Mikroskop (Abb. 4), findet man alle Kristalle so wieder, wie sie anfänglich gelegen haben. Ganze Züge großer Kristalle liegen vermischt mit Herden von kleinen in regelmäßigen Abständen. Nichts liegt wild durcheinander oder gar übereinander, sondern alles bietet sich so dar, wie es ursprünglich entstanden. Die Beobachtung und Bestimmung ist dadurch bedeutend erleichtert, da auch die kleineren, meist sehr deutlich ausgebildeten Kristalle sehr gut zu sehen sind. Alle Größenberechnungen, Winkelmessungen, Polarisationserscheinungen, Einschlüsse, kurz alles, was einen interessiert, kann immer wieder und wieder beobachtet werden und ist jedem Dritten sofort zugänglich. Hierin scheint dem Verfasser aber der besondere Wert der Methode zu liegen.

Die im vorliegenden beschriebene Methode läßt sich gut mit dem Verfahren kombinieren, das ich seinerzeit in dieser Zeitschrift veröffentlicht habe[2].

Die bei der dort beschriebenen mikrochemischen Tüpfelmethode erhaltenen Teste auf Gallerten lassen sich nach der hier beschriebenen Methode ebenfalls mit Kollodiumschichten überziehen und auswaschen. Das gleiche gilt von den verschiedenen Gelatinepapiermethoden. Als Unterlagen für letztere läßt sich statt des Papiers ebenfalls Glas verwenden, wodurch diese Methode der mikroskopischen Betrachtung zugänglicher wird.

Über die Kombination der hier erwähnten Methoden soll in einem weiteren Aufsatz berichtet werden.

[2] Mikrochemie, **XII**, 119 (1932).

Joachim Winckelmann, Über eine neue Methode der präparativen Mikrochemie.

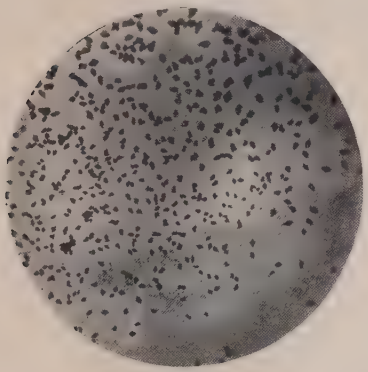


Abb. 1.
Alle Kristalle liegen übersichtlich nebeneinander.

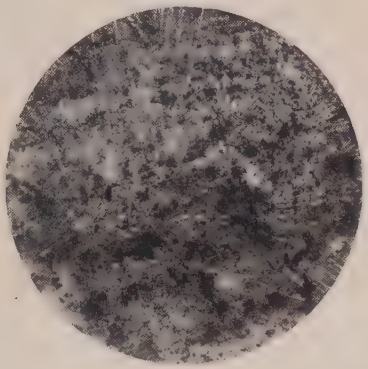


Abb. 2.
Die unvermeidlichen Zusätze haben beim Eintrocknen das Bild vollkommen undeutlich gemacht.

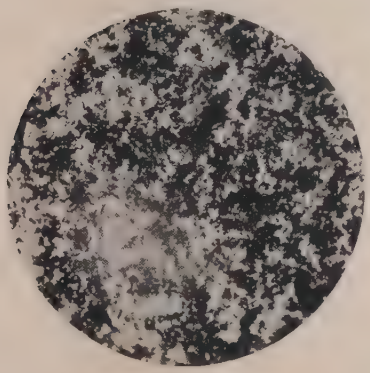


Abb. 3.
Beim Auswaschen sind alle Kristalle zusammengefallen.

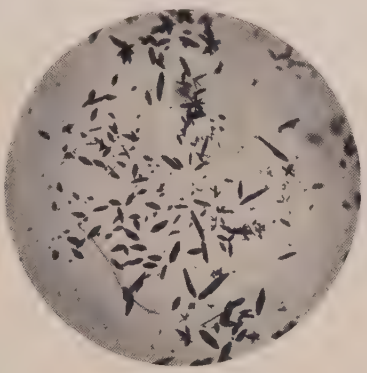


Abb. 4.
Unter der Kollodiumschicht liegen alle Kristalle nach der Behandlung tadellos nebeneinander.
Die ursprüngliche Lage ist vollkommen erhalten geblieben.

Verlag **Emil Haim & Co.. Wien und Leipzig.**

Nachweis und Mikrobestimmung von Silber, Quecksilber und Jodiden.

Von

I. M. Korenman,

Odessa.

(Eingelangt am 13. September 1933.)

Aus den Arbeiten von H. Landolt[1] ist bekannt, daß die Reaktion zwischen Jodat und Sulfit:

$$2\,JO_3' + 5\,SO_2 + 2\,H\cdot \rightarrow 5\,SO_4'' + H_2O + J_2$$

langsam verläuft und daß auf die Reaktionsgeschwindigkeit eine Reihe von Faktoren einwirken; so beschleunigen z. B. NaCl, NH_4Cl und freie Säuren die Reaktion katalytisch. Später hat C. Zenghelis[2] darauf hingewiesen, daß Quecksilbersalze und Cyaniden die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen HJO_3 und SO_2 verlangsamen.

Im Anschluß an besagte Angaben ist von mir die Anwendbarkeit der Reaktion zwischen HJO_3 und SO_2 zum katalytischen Nachweis verschiedener Stoffe geprüft worden. Die Reaktion habe ich wie folgt durchgeführt: Zu 2 ccm Wasser und gleichzeitig zu 2 ccm der zu untersuchenden verdünnten Lösung wurden je 0,5 ccm 1n-H_2SO_4-, mehrere Tropfen Stärkelösung und je ein bis drei Tropfen 0,5%iger KJO_3- und Na_2SO_3-Lösung zugesetzt, worauf nach einiger Zeit schlagartig eine Blaufärbung auftrat. Von der KJO_3- und Na_2SO_3-Lösung wurden soviel Tropfen verwendet, daß die Blaufärbung im Blindversuch 1,5 bis 2 Minuten nach der Vermengung sämtlicher Lösungen einsetzte. Selbstverständlich kam sowohl bei der zu analysierenden Lösung als auch beim Blindversuch die gleiche Menge an Reagenzien zur Verwendung. Es zeigte sich, daß, je nach der Art der in der Versuchslösung enthaltenen Stoffe, die Blaufärbung rascher oder langsamer als im Blindversuche auftrat.

Eine Beschleunigung der Landolt-Reaktion wurde durch die nachstehend angeführten Ionenarten (bei den gleichfalls angegebenen Verdünnungen) festgestellt:

[1] B., **19**, 1317—1365 (1886); **20**, 745—760 (1887).

[2] C., **1911**, II, 587.

$F' = 1 : 5000 (KF)$. $Sn'' = 1 : 800.000 (SnCl_2)$.
$Cl' = 1 : 300.000$ (NaCl). $Cu'' = 1 : 80.000$ ($CuSO_4$).
$Br' = 1 : 150.000$ (KBr). $Mn'' = 1 : 1{,}000.000$ ($MnCl_2$).
$J' = 1 : 4{,}000.000$ (KJ).
$CN' = 1 : 60.000$ (KCN).
$CNS' = 1 : 165.000$ (NH_4CNS).

Beschleunigt wird die Reaktion auch von $SbCl_3$, $(NH_4)_2MoO_4$, $K_4Fe(CN)_6$ u. a.

Aus den vorstehenden Daten ergibt sich, daß eine analytische Auswertung der katalytischen Beschleunigung nicht möglich ist, weil dieselbe zu vielen Stoffen zukommt.

Bezeichnender ist die Hemmung der LANDOLT-Reaktion. Ich konnte feststellen, daß außer den Quecksilbersalzen auch Silbersalze eine Hemmung bewirken, wobei folgende Daten gelten:

$Hg'' = 1{:}1.500.000$, das ist 0,66 γ Hg'' in 1 ccm $HgCl_2$, $Hg(NO_3)_2$. $Hg(CN)_2$, $Hg(CH_3COO)_2$.
$Hg' = 1{:}1{,}000.000$, das ist 1 γ Hg' in 1 ccm $Hg_2(NO_3)_2$.
$Ag' = 1{:}2{,}000.000$, das ist 0,5 γ Ag' in 1 ccm $AgNO_3$.

Bei den besagten Verdünnungen tritt gar keine Blaufärbung auf; es handelt sich demnach nicht um eine Verlangsamung, sondern offenbar um eine Verhinderung der LANDOLT-Reaktion.

Folgende Ionen üben nach unseren Beobachtungen keinen katalytischen Einfluß aus: Co'', Ni'', Fe'', Fe''', Cr''', Al''', Zn'', Pb'', Bi''', Cd'', AsO_3''', AsO_4''', PO_4''', H_2PO_2', BO_3''', B_4O_7'', $HCOO'$, CH_3COO', C_2O_4'', $C_6H_4O_4''$, NO_3', SO_4''.

Bei der Durchführung unserer Versuche wurde festgestellt, daß auf Zusatz von Quecksilber- und Silbersalzen zu einer Jod-Stärke-Lösung die Blaufärbung verschwindet. Diese Erscheinung kann zu analytischen Zwecken verwendet werden. Im Schrifttum liegt eine Angabe von I. M. KOLTHOFF[3] darüber vor, daß sich freies Jod in Lösung bei Gegenwart von überschüssigem $HgCl_2$ nicht nachweisen läßt. Wie nachstehende Versuche zeigen, kommt diese Wirkung nicht nur $HgCl_2$, sondern auch anderen Merkurisalzen sowie Merkuro- und Silbersalzen zu.

Je 2 ccm verdünnte Lösungen von Hg'', Hg' oder Ag' wurden mit

[3] Pharmac. Weekbl., 56, 391 (1919); zit. n. TH. DÖRING, Analyt. Chem. (russ. Übers.), 83 (1922).

Stärkelösung versetzt und tropfenweise Jodlösung einfließen gelassen. An der Einfallsstelle des Tropfens zeigt sich eine Blaufärbung, die sofort verschwindet. Wird eine große Jodmenge zugesetzt, so färbt sich die Lösung gelb. Diese Färbung rührt von freiem Jod her, da beim Schütteln mit $CHCl_3$ sich letzteres violett färbt. Es tritt somit in der freies, überschüssiges Jod und Stärke enthaltenden Lösung keine Blaufärbung auf, wenn geringe Mengen von Quecksilber oder Silbersalzen zugesetzt werden.

Zur Bestimmung der Empfindlichkeit dieser Salzwirkung wurden folgende Versuche angestellt. In zwei Probiergläschen wurden 2 ccm Wasser und 2 ccm verdünnter Untersuchungslösung und je mehrere Tropfen Stärke hineingebracht. Sodann wurde in das mit Wasser beschickte Probierröhrchen tropfenweise 0.02%ige wäßrige Jodlösung bis zum Auftreten einer merklichen Blaufärbung zugesetzt, wozu in der Regel fünf bis acht Tropfen erforderlich waren. Die gleiche Jodmenge der Untersuchungslösung zugesetzt, ergab entweder gar keine oder eine schwächere Blaufärbung als im Blindversuch. Selbstverständlich darf die Untersuchungslösung weder Oxydations- noch Reduktionsmittel enthalten. Nach diesem Verfahren ließen sich folgende Metalle nachweisen:

$Hg^{\cdot\cdot} = 1 : 5{,}400.000$, das ist 0.2 γ $Hg^{\cdot\cdot}$ in 1 ccm [$HgCl_2$, $Hg(NO_3)_2$, $Hg(CH_3COO)_2$].

$Hg^{\cdot\cdot} = 1 : 3{,}700.000$, das ist 0.27 γ $Hg^{\cdot\cdot}$ in 1 ccm [$Hg(CN)_2$].

$Hg^{\cdot} = 1 : 7.000.000$, das ist 0.14 γ $Hg^{\cdot}$ in 1 ccm [$Hg_2(NO_3)_2$].

$Ag^{\cdot} = 1{:}20{,}000.000$, das ist 0,05 γ $Ag^{\cdot}$ in 1 ccm ($AgNO_3$).

In saurem Medium (H_2SO_4, HNO_3) ist die Empfindlichkeit höher. $Bi(NO_3)_3$, $SbCl_3$ und Na_3AsO_3 können in relativ starken Lösungen das Zustandekommen von Blaufärbung verhindern: $Bi = 1 : 10.000$: $Sb = 1 : 200.000$; $As^{III} = 1 : 50.000$. Diese Wirksamkeit ist auf Bildung von $HBiJ_4$ sowie auf die Oxydation von Sb^{III} und As^{III} mit Jod zurückzuführen. $Co^{\cdot\cdot}$, $Ni^{\cdot\cdot}$, $Mn^{\cdot\cdot}$, $Zn^{\cdot\cdot}$, $Fe^{\cdot\cdot}$, $Fe^{\cdot\cdot\cdot}$, $Al^{\cdot\cdot\cdot}$, $UO_2^{\cdot\cdot}$, $Sn^{\cdot\cdot}$, $AsO_4^{\prime\prime\prime}$, $Cd^{\cdot\cdot}$, $Cu^{\cdot\cdot}$ und $Pb^{\cdot\cdot}$-Salze sind unwirksam. Sind Jodide oder Chloride im Überschuß zugegen, dann tritt selbst bei Vorhandensein von Quecksilber oder Silber Blaufärbung auf. Mit Hilfe dieser Reaktionen lassen sich geringe Mengen von Quecksilber- und Silbersalzen, auch neben viel Blei-, Kupfer- und Kadmiumsalzen nachweisen, wie folgende Daten zeigen:

$Hg^{··}$: Pb = 1 : 13.000,	Erfassungsgrenze	0,75	γ $Hg^{··}$	in 1 ccm
$Hg^{··}$: Cu = 1 : 1600	„	0,75	γ $Hg^{··}$	„ 1 „
$Hg^{··}$: Cd = 1 : 4000	„	1,5	γ $Hg^{··}$	„ 1 „
$Hg^{·}$: Pb = 1 : 10.000	„	1	γ $Hg^{·}$	„ 1 „
$Hg^{·}$: Cu = 1 : 1250	„	1	γ $Hg^{·}$	„ 1 „
$Hg^{·}$: Cd = 1 : 1500	„	5	γ $Hg^{·}$	„ 1 „
$Ag^{·}$: Pb = 1 : 10.000	„	1	γ $Ag^{·}$	„ 1 „
$Ag^{·}$: Cu = 1 : 1250	„	1	γ $Ag^{·}$	„ 1 „
$Ag^{·}$: Cd = 1 : 3000	„	2	γ $Ag^{·}$	„ 1 „

Bekanntlich geben freie, wäßrige Jodlösungen mit Stärke keine Färbung; zum Zustandekommen der Blaufärbung ist die Gegenwart (sei es auch nur von Spuren) eines Jodids erforderlich. Folgende Beobachtungen zeigen, daß der Grund des Ausbleibens der Blaufärbung bei Gegenwart von Quecksilber- und Silbersalzen in der Bindung des (in geringer Menge selbst in wäßrigen Jodlösungen enthaltenen) Jodids unter Bildung von sehr schwer löslichem Quecksilber- und Silberjodid zu suchen ist:

1. Auf Zugabe von überschüssigem KJ zu der farblosen Mischung $Hg^{··} + J_2$ + Stärke tritt Blaufärbung auf.

2. Die Blaufärbung in der Lösung von J_2 + KJ + Stärke wird durch die K_2HgJ_4-Lösung nicht allein nicht vernichtet, sondern noch etwas vertieft, was sich mit dem J'-Ionengehalt in dieser Lösung erklärt:

$$HgJ_4^{''} \rightleftarrows HgJ_2 + 2\,J'$$

3. Bei Zugabe von $Hg^{··}$ oder $Ag^{·}$ zur Lösung von J_2 + KJ + + Stärke verschwindet die Blaufärbung. Je mehr KJ in der Lösung enthalten ist, desto mehr Hg- oder Ag-Salz ist zur Vernichtung der Blaufärbung erforderlich. Zu 2 ccm KJ-Lösung von verschiedener Konzentration wurden 5 Tropfen Stärkelösung und 3 Tropfen 0,02%iger wäßriger Jodlösung zugefügt. In die blaue Lösung kamen aus einer Mikrobürette stets 0,001 mol. $HgCl_2$- oder $AgNO_3$-Lösung bis zur Entfärbung.

Die in Tabelle 1 eingetragenen Werte zeigen, daß die Blaufärbung nach restloser Jodbindung verschwindet. Dies erklärt, warum die Quecksilber- und Silbersalze den Ablauf der LANDOLT-Reaktion verhindern: sie binden den HJ, das Zwischenprodukt der Reaktion.

Die gewonnenen Erfahrungen ließen sich auch für eine mikromaßanalytische Bestimmung von Jodiden, Quecksilber- und Silber

Tabelle 1.

Konzentration der KJ-Lösung	Verbraucht zur Vernichtung der Blaufärbung	
	ca. 0,001 mol. $HgCl_2$-Lösung	ca. 0,001 mol. $AgNO_3$-Lösung
0,001 mol.	1,06 ccm	1,90 ccm
0,0005 „	0,53 „	0,95 „
0,00025 „	0,26 „	0,47 „
0,000125 „	0,14 „	0,23 „
0,0000625 „	0,07 „	0,12 „

salzen verwenden. Das Prinzip der Bestimmung besteht in folgendem: Die Jodid, Jod und Stärke enthaltende Lösung wird aus der Mikrobürette mit Hg- oder Ag-Lösung versetzt, wobei die Blaufärbung verschwindet, wenn alles Jodid zu HgJ_2 oder AgJ verbunden ist. Bei Verwendung von 0,01 bis 0,02 n-Lösungen beobachtete ich einen jähen Umschlag der Färbung. Zu beachten ist, daß reine Jodlösungen auch einen geringen Jodidgehalt aufweisen und demgemäß eine geringe Menge Hg- oder Ag-Salz zur Entblauung verbrauchen. Dieser Wert (etwa 0,01 bis 0,02 ccm 0,01 n-$HgCl_2$) ist in einem Blindversuch festzustellen und von den Titrationswerten abzuziehen.

Die Anwendung von Jodstärke als Indikator ist von I. M. Kolthoff[4] empfohlen worden. Nach I. M. Kolthoff geschieht die Bestimmung der Jodide in schwefelsaurem oder neutralem Medium; als Indikator dient 0,1 n-KJO_3-Lösung oder alkoholische Jodlösung. I. M. Kolthoff macht darauf aufmerksam, daß die Titrierung gut gelingt, wenn die Jodidkonzentration nicht unter 0,05 n ist, in schwächeren Lösungen erreicht der Titrierungsfehler 10%. Die von mir empfohlene Methodik ermöglicht eine hinreichend genaue Bestimmung sowohl von Jodiden als auch von Silber und Quecksilber selbst in 0,001 n- und schwächeren Lösungen.

Titrierlösungen.

1. Sublimatlösung. Sublimat wird aus heißem Wasser umkristallisiert, 2—3mal mit kaltem Wasser gewaschen und bei 100° getrocknet. Durch Auflösung von 13,5770 g $HgCl_2$ in 1 Liter Wasser wurde eine 0,1 Normallösung hergestellt und deren Titer durch jodometrische Bestimmung nach Rupp[5] kontrolliert. Aus

[4] Die Maßanalyse (russ. Übers.), **2**, 234 (1932).

[5] Arch. Pharmaz., **243**, 300 (1905); zit. nach I. M. Kolthoff, 437.

Dieser Stammlösung wurden durch Verdünnung 0,02 bis 0,005 n-$HgCl_2$-Lösungen bereitet. Titration mit $HgCl_2$-Lösungen, die schwächer als 0,005 n sind, hat ungenaue Ergebnisse zur Folge.

2. Jodkaliumlösung. Man bereitet durch Auflösung von KJ eine 0,1 n-Lösung und stellt deren Titer nach MOHR ein. Durch Verdünnung werden schwächere Lösungen erhalten.

3. 0,5%ige Stärkelösung wird in üblicher Weise hergestellt.

4. 0,5%ige Jodlösung in Alkohol.

Quantitative Jodidbestimmung.

Zu 10 bis 20 ccm Jodidlösung (z. B. KJ) werden 1 ccm Stärkelösung und drei bis fünf Tropfen Jodlösung zugesetzt und aus einer Mikrobürette solange 0,005 bis 0,01 n-$HgCl_2$ zufließen gelassen, bis die Blaufärbung verschwindet. Starke Jodidlösungen sind vor der Titration mit Wasser zu verdünnen, um zu verhindern, daß größere Mengen von unlöslichem HgJ_2 die Erkennung des Endpunktes erschweren. Es lassen sich jedoch auch ohne Verdünnung Bestimmungen bei parallel angesetzten Blindversuchen ausführen.

Tabelle 2.

Versuch Nr.	Jodid gegeben mg	Volumen in ccm	Titer der $HgCl_2$-Lösung	Jodid gefunden mg	Differenz mg	Differenz %
1	6.84	20	0,01 n	6.73	— 0.11	1.65
2	5.49	20	0.01 n	5.46	— 0,03	0.55
3	4.12	20	0.01 n	4.06	— 0.06	1.45
4	2.74	20	0.01 n	2.73	— 0.01	0.36
5	2.06	20	0,01 n	2.03	— 0,03	1,41
6	1.37	20	0,01 n	1,37	—	—
7	1.37	20	0.005 n	1.29	— 0.08	5.84
8	1.37	10	0.005 n	1,31	— 0.06	4.37
9	0.68	20	0,01 n	0,66	— 0.02	2,94
10	0.68	20	0.01 n	0.67	— 0,01	1,47
11	0.68	20	0,005 N	0,63	— 0.05	7.35
12	0.68	10	0.005 N	0,65	— 0,03	4,40
13	0.41	20	0,01 N	0,41	—	—
14	0.41	10	0.005 N	0,41	—	—
15	0,41	20	0.005 N	0,41	—	—
16	0.14	20	0.01 N	0.14	—	—
17	0.14	20	0.005 N	0.13	— 0.01	7.4

Die Jodidtitration mit Sublimat ohne Indikator[6] bis zum Auftreten einer HgJ_2-Trübung liefert zu niedrige Werte, besonders in stark verdünnten Jodidlösungen.

Die Gegenwart von 10- bis 15fachem Chloridüberschuß beeinflußt die Jodidbestimmung. Bromide und Rhodanide behindern die Bestimmung.

Die Titration von Jodiden mit $AgNO_3$ bei Gegenwart von Jod und Stärke als Indikatoren ergab ebenfalls befriedigende Resultate. Zum Vergleich seien nachstehend auch die Werte der Jodidbestimmung nach MOHR angeführt. Der Farbumschlag bei der Titration von verdünnten KJ-Lösungen nach MOHR (Indikator K_2CrO_4) ist undeutlich, da der Niederschlag von AgJ selbst gelb gefärbt ist.

Tabelle 3.

Versuch Nr.	Jodid gegeben mg	Volumen in ccm	Titer der $AgNO_3$-Lösung	Jodid gefunden in mg	
				Indikator K_2CrO_4	Indikator Jod + Stärke
1	4,12	20	0,01 n	4,27	4,01
2	2,74	20	0,01 n	2,85	2,79
3	1,37	20	0,01 n	1,55	1,36
4	0,68	20	0,01 n	0,78	0,65
5	0,68	20	0,001 n	—	0,68
6	0,48	20	0,001 n	—	0,48
7	0,27	20	0,001 n	—	0,27
8	0,14	20	0,001 n	—	0,14

In den Versuchen 5 bis 8 erwies sich die Bestimmung nach MOHR als unanwendbar — es ergaben sich sehr hohe Werte. Farbenübergang bei der Titration mit $AgNO_3$-Lösung in Gegenwart von Jodstärke: von Blau in Gelb.

Quantitative Bestimmung von Quecksilber und Silber.

Man bringt in ein Gläschen oder Probierröhrchen 3 ccm annähernd 0,01 n-KJ-Lösung, 1 ccm Stärke, zwei bis drei Tropfen Jodlösung und titriert mit der zu analysierenden neutralen oder schwachsauren Probelösung bis zum Verschwinden der Blaufärbung. Die Anwesenheit von Pb-, Cu- oder Cd-Salzen stört die Titration nicht.

Unmittelbare Titration von Quecksilber- und Silbersalzen mit KJ-Lösung bei Gegenwart von Jod und Stärke (Ende der Titration

[6] S. z. B. I. M. KOLTHOFF, a. a. O., S. 269 und 270.

Tabelle 4.

Versuch Nr.	Gegeben Ag mg/ccm	Zusatz	Gefunden Ag mg/ccm	Differenz mg/ccm	Differenz %
1	1,10	—	1,07	0,03	2,73
2	0,66	—	0,662	0,002	0,3
3	0,44	—	0,44	—	—
4	0,22	—	0,221	0,001	0,45
5	0,10	—	0,10	—	—
6	0,055	—	0,056	0,001	1,82
7	0,22	2,5 mg cm^3 $Cu^{\cdot\cdot}$	0,221	0,001	0,45
8	0,22	5,0 mg cm^3 $Cu^{\cdot\cdot}$	0,221	0,001	0,45
9	0,22	2,5 mg cm^3 $Pb^{\cdot\cdot}$	0,219	0,001	0,45
10	0,22	2,0 mg cm^3 $Pb^{\cdot\cdot}$	0,219	0,001	0,45

Tabelle 5.

Versuch Nr.	Gegeben Hg mg/ccm	Zusatz	Gefunden Hg mg/ccm	Differenz mg/ccm	Differenz %
1	1,605	—	1,622	0,017	1,06
2	1,203	—	1,218	0,015	1,24
3	0,60	—	0,60	—	—
4	0,20	—	0,219	0,019	9,5
5	0,10	—	0,10	—	—
6	0,20	2 mg/ccm $Pb^{\cdot\cdot}$	0,192	0,008	4,0
7	0,20	20 mg/ccm $Pb^{\cdot\cdot}$	0,185	0,015	7,5
8	0,20	2,5 mg/ccm $Cu^{\cdot\cdot}$	0,194	0,006	3,0
9	0,20	5 mg/ccm $Cu^{\cdot\cdot}$	0,198	0,002	1,0
10	0,20	8 mg/ccm $Cd^{\cdot\cdot}$	0,196	0,004	2,0

Auftreten von Blaufärbung) lieferte befriedigende Resultate lediglich bei Silberbestimmungen.

Zusammenfassung.

Läßt man freies Jod auf Stärke einwirken, so tritt Blaufärbung lediglich bei Gegenwart löslicher Jodide auf. Ein Zusatz von Quecksilber- oder Silbersalzen bewirkt unter Bildung unlöslicher Jodide eine Entfärbung. Diese Erscheinung läßt sich zum Nachweis und zur Bestimmung von Quecksilber- und Silbersalzen sowie zur Bestimmung von Jodiden verwenden.

Die stufenphotometrische Mikroanalyse des Trink- und Nutzwassers.

(VIII. und IX. Mitteilung.)

Von

Carl Urbach.

Aus dem Physiologischen Institut der Deutschen Universität in Prag.

(Eingelangt am 13. September 1933.)

VIII. Mitteilung.

Quantitative Bestimmung der Kieselsäure.

Zur quantitativen Bestimmung geringer SiO_2-Mengen im Wasser, wäßrigen Bodenauszügen sowie tierischen und pflanzlichen Geweben bedient man sich in der Regel kolorimetrischer Methoden. Von älteren Arbeiten ist jene von Diénert und Wanderbulcke[1] hervorzuheben, die für die Kieselsäurebestimmung im Wasser vorgeschlagen wurde. Durch Zusatz von Ammoniummolybdat zu der mit Schwefelsäure angesäuerten kieselsäurehaltigen Lösung wird die Bildung der Silikomolybdänsäure hervorgerufen, deren Gelbfärbung gegen eine Vergleichslösung (Pikrinsäure oder Kaliumchromat) gemessen wird. M. L. Isaacs[2] verwendet nicht die gelbe Lösung, sondern unterwirft diese einer weiteren Reduktion, wobei eine Blaufärbung auftritt. Eine Reihe anderer Autoren befassen sich mit derselben Frage, unter denen J. King[3], J. A. Foulgers[4], L. A. Thayer[5], A. Němec, J. Lanik und A. Koppova[6] sowie O. Lieb

[1] Compt. rend. Acad. Sciences, **176**, 1478 (1923).
[2] Bul. de la Soc. de Chimie biol., **6**, 157 (1924).
[3] Journ. of biolog. Chem., **80**, 25 (1928).
[4] Journ. Amer. chem. Soc., **49**, 4429 (1927).
[5] Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed., **2**, 276 (1930).
[6] Ztschr. analyt. Chem., **83**, 429 (1931).

KNECHT, GERB und BAUER[7] genannt seien. Eine eingehende Kritik der wichtigsten Methoden findet man in der oben zitierten Arbeit von NĚMEC[6] und sei deshalb hier unterlassen.

Wie bekannt, bildet die Kieselsäure ebenso wie die Phosphorsäure mit Ammoniummolybdat einen gelben Komplex, der sich unter Auftreten einer Blaufärbung reduzieren läßt. Diese Tatsache läßt sich nun insofern ausnützen, daß man das für die Bestimmung der Phosphorsäure ausgearbeitete Verfahren[8] mit den dazu notwendigen Abänderungen auf die Bestimmung der Kieselsäure überträgt. Zwar wird eine gleichzeitige Bestimmung beider Säuren durch diese Ähnlichkeit im Verhalten sehr erschwert, aber auch diese Komplikation konnte, wie in der nächsten Mitteilung geschildert wird, überwunden werden. Hier sei nur die Bestimmung der Kieselsäure besprochen, da ja meistens die Phosphorsäure nur in derart geringen Mengen im Wasser vorhanden ist, daß sie bei Verwendung des kleinen Volumens Wasser, das zur Bestimmung der Kieselsäure notwendig ist, nicht stören kann.

Zur Erzielung der Blaufärbung wurde als Reduktionsmittel

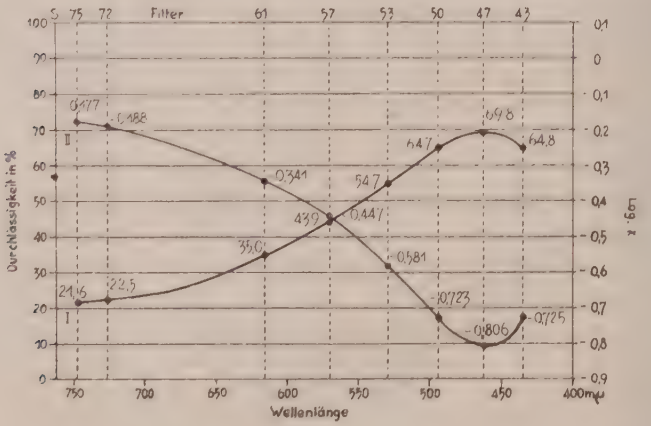


Abb. 1.

Typische Farbkurve eines Silikomolybdänsäurekomplexes, erhalten durch Reduktion mit Hydrochinon. Konzentration 0,42 mg% SiO_2. Gemessen gegen H_2O bei einer Schichtdicke von 10 mm.

[7] Ztschr. angew. Chem., **44**, 860 (1931).

[8] C. URBACH, Mikrochemie, **XIII**, 201 (1933).

Hydrochinon verwendet. Bei reinen SiO_2-Lösungen zeigte es sich, daß sich die oben erwähnte Vorschrift auch für die SiO_2-Bestimmung sehr gut eignet. Die erhaltene Blaufärbung zeigte dieselbe typische Farbkurve (Abb. 1), wobei hervorgehoben sei, daß sich der Silikomolybdänsäurekomplex zwar langsamer als der entsprechende Phosphormolybdänsäurekomplex bildet, dabei aber auch viel beständiger ist.

Es wurden nun Lösungen verschiedener SiO_2-Konzentrationen vorschriftsmäßig gefärbt und unter Vorschaltung des Filters S 61 mit einer Schichtdicke von 20 mm gegen optisch reines Wasser gemessen. Die Standardlösung erhielten wir durch Auflösen einer berechneten Menge Natriumsilikat (Präparat MERCK) in Wasser und nachherige gravimetrische Kontrollbestimmung. 10 ccm dieser Standardlösung enthielten 0,42 mg SiO_2. Eine Lösung obgenannter Konzentration ist nach dem Schema

$$Na_2SiO_3 + 2\,H_2O \rightleftharpoons H_2SiO_3 + 2\,NaOH$$

vollständig hydrolysiert (KAHLENBERG und LINCOLN[9]).

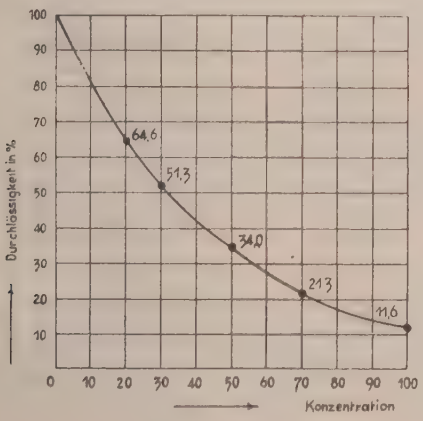


Abb. 2.

Eichkurve der direkten Ablesewerte für den SiO_2-Gehalt eines Silikomolybdänsäurekomplexes, erhalten durch Reduktion mit Hydrochinon, wobei 100% einer Konzentration von 0,42 mg% SiO_2 entsprechen.

Schichtdicke 20 mm. Filter S 61. Gemessen gegen H_2O.

[9] ABEGG, III, II. Abt. 332, S. Hirzel, Leipzig 1909.

In Abb. 2 sind die Konzentrationen und die entsprechenden direkten Ablesewerte der Durchlässigkeit in ein Diagramm eingetragen. Die erhaltenen negativen Logarithmen ergaben eine Gerade (Abb. 3), was die Gültigkeit des BEER'schen Gesetzes für diese Färbung bestätigt.

Schließlich mußte noch die Beständigkeit der gefärbten Lösung festgestellt werden. Die in dieser Richtung geführten Versuche

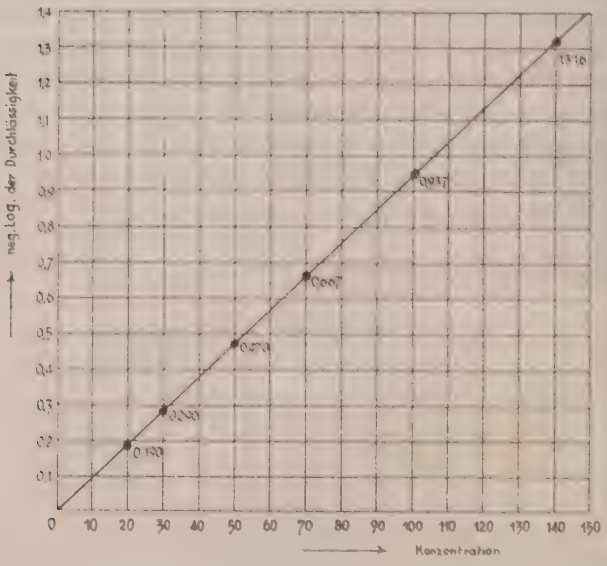


Abb. 3.

Eichkurve der negativen Logarithmen der Durchlässigkeit für den SiO_2-Gehalt eines Silikomolybdänsaurekomplexes erhalten durch Reduktion mit Hydrochinon, wobei 100% einer Konzentration von 0,42 mg% SiO_2 entsprechen.

Schichtdicke 20 mm. Filter S 61. Gemessen gegen H_2O.

zeigten, daß die Farbintensität der gefärbten Lösung durch mindestens zwei bis drei Stunden unveränderlich bleibt.

Folgende Reagenzien sind also zur Ausführung einer Kieselsäurebestimmung im Wasser notwendig:

1. Molybdänsäurelösung.
2. Hydrochinonlösung.
3. Carbonatsulfitmischung.

Ad 1. 50 g reines Ammoniummolybdat werden in 1000 ccm phosphorfreier 1 n-Schwefelsäure gelöst, wobei jede Erhitzung zu vermeiden ist. 5 ccm dieser Lösung versetzt man mit 5 ccm der Hydrochinonlösung (2.) und fügt nach fünf Minuten 25 ccm Carbonatsulfitmischung (3.) hinzu. Die Lösung muß farblos bleiben. Ist dies nicht der Fall, so war das verwendete Ammoniummolybdat oder die Schwefelsäure verunreinigt und die Lösung ist unbrauchbar.

Ad 2. 20 g Hydrochinon löst man unter Zusatz von 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure in 1000 ccm Wasser. Die Lösung muß gut verschlossen aufbewahrt werden. Dunkel gefärbte Lösungen sind unbrauchbar.

Ad 3. 75 g Natriumsulfit (wasserfrei) löst man in 500 ccm Wasser und fügt 2 Liter einer 20%igen Lösung wasserfreier Soda hinzu. Die Lösung wird filtriert. Die Carbonatsulfitmischung muß gut verschlossen aufbewahrt werden und ist höchstens zwei Wochen haltbar.

Zur Ausführung der Bestimmung werden 5 bis 30 ccm Wasser, je nach dem Gehalt an Kieselsäure, in einen 100 ccm fassenden Meßkolben gebracht. Falls weniger als 30 ccm Wasser verwendet werden, muß soviel destilliertes Wasser zugegeben werden, daß das Volumen etwa 30 ccm beträgt. Darauf werden 5 ccm Molybdänsäure- und 5 ccm Hydrochinonlösung zugesetzt, geschüttelt und mindestens fünf Minuten stehengelassen. Nun werden 32 ccm der Carbonatsulfitmischung zugefügt, bis zur Marke aufgefüllt, durchgemischt und photometriert. Die stufenphotometrische Messung erfolgt nach zehn Minuten langem Beleuchten der Küvette mit der Stupholampe unter Vorschaltung des Filters S 61 bei einer Schichtdicke von 10, bezw. 20 mm gegen optisch reines Wasser.

Die dem Trommelablesewerte entsprechende SiO_2-Menge in mg wird den Eichkurven (Abb. 2 und 3) oder einfacher den Tabellen I und II entnommen und ergibt den SiO_2-Gehalt der gefärbten Lösung.

Tabelle 1.

Aufstellung der dem Trommelablesewerten entsprechenden SiO_2-Mengen in mg der vorschriftsmäßig hergestellten Lösung bei einer Schichtdicke von 10 mm unter Vorschaltung des Filters S 61.

D = Ablesewert an der Trommel. A = SiO_2 in mg.

D	A	D	A	D	A	D	A	D	A
2,0	1,218	5,7	1,112	9,4	0,918	13,1	0,789	16,8	0,692
2,1	1,209	5,8	1,105	9,5	0,913	13,2	0,786	16,9	0,690
2,2	1,482	5,9	1,098	9,6	0,910	13,3	0,783	17,0	0,688
2,3	1,464	6,0	1,092	9,7	0,906	13,4	0,780	17,1	0,685
2,4	1,448	6,1	1,086	9,8	0,902	13,5	0,777	17,2	0,683
2,5	1,432	6,2	1,079	9,9	0,898	13,6	0,774	17,3	0,681
2,6	1,416	6,3	1,073	10,0	0,894	13,7	0,771	17,4	0,678
2,7	1,402	6,4	1,067	10,1	0,890	13,8	0,769	17,5	0,676
2,8	1,388	6,5	1,060	10,2	0,886	13,9	0,766	17,6	0,674
2,9	1,374	6,6	1,054	10,3	0,882	14,0	0,763	17,7	0,672
3,0	1,361	6,7	1,049	10,4	0,878	14,1	0,760	17,8	0,670
3,1	1,349	6,8	1,043	10,5	0,875	14,2	0,758	17,9	0,668
3,2	1,336	6,9	1,037	10,6	0,871	14,3	0,755	18,0	0,666
3,3	1,323	7,0	1,032	10,7	0,867	14,4	0,752	18,1	0,663
3,4	1,313	7,1	1,027	10,8	0,864	14,5	0,749	18,2	0,661
3,5	1,301	7,2	1,021	10,9	0,860	14,6	0,747	18,3	0,658
3,6	1,291	7,3	1,015	11,0	0,857	14,7	0,744	18,4	0,656
3,7	1,280	7,4	1,011	11,1	0,853	14,8	0,741	18,5	0,655
3,8	1,269	7,5	1,005	11,2	0,849	14,9	0,739	18,6	0,653
3,9	1,259	7,6	1,000	11,3	0,846	15,0	0,736	18,7	0,651
4,0	1,249	7,7	0,995	11,4	0,843	15,1	0,734	18,8	0,648
4,1	1,239	7,8	0,990	11,5	0,839	15,2	0,731	18,9	0,647
4,2	1,230	7,9	0,985	11,6	0,836	15,3	0,729	19,0	0,644
4,3	1,221	8,0	0,980	11,7	0,833	15,4	0,726	19,1	0,642
4,4	1,213	8,1	0,975	11,8	0,829	15,5	0,724	19,2	0,640
4,5	1,204	8,2	0,970	11,9	0,826	15,6	0,721	19,3	0,638
4,6	1,195	8,3	0,966	12,0	0,823	15,7	0,719	19,4	0,636
4,7	1,187	8,4	0,962	12,1	0,820	15,8	0,716	19,5	0,634
4,8	1,179	8,5	0,956	12,2	0,816	15,9	0,714	19,6	0,632
4,9	1,170	8,6	0,952	12,3	0,813	16,0	0,711	19,7	0,630
5,0	1,163	8,7	0,948	12,4	0,810	16,1	0,709	19,8	0,628
5,1	1,155	8,8	0,944	12,5	0,807	16,2	0,706	19,9	0,627
5,2	1,147	8,9	0,939	12,6	0,804	16,3	0,704	20,0	0,625
5,3	1,140	9,0	0,935	12,7	0,801	16,4	0,702	20,2	0,621
5,4	1,133	9,1	0,930	12,8	0,798	16,5	0,700	20,4	0,617
5,5	1,126	9,2	0,926	12,9	0,795	16,6	0,697	20,6	0,613
5,6	1,119	9,3	0,922	13,0	0,792	16,7	0,695	20,8	0,609

D	A	D	A	D	A	D	A	D	A
21,0	0,606	28,2	0,491	35,4	0,403	46,5	0,297	69,0	0,144
21,2	0,602	28,4	0,489	35,6	0,401	47,0	0,293	70,0	0,138
21,4	0,598	28,6	0,486	35,8	0,399	47,5	0,289	71,0	0,133
21,6	0,595	28,8	0,483	36,0	0,396	48,0	0,285	72,0	0,127
21,8	0,591	29,0	0,480	36,2	0,394	48,5	0,281	73,0	0,122
22,0	0,588	29,2	0,478	36,4	0,392	49,0	0,277	74,0	0,117
22,2	0,584	29,4	0,475	36,6	0,390	49,5	0,273	75,0	0,112
22,4	0,581	29,6	0,472	36,8	0,388	50,0	0,269	76,0	0,106
22,6	0,577	29,8	0,470	37,0	0,386	50,5	0,265	77,0	0,101
22,8	0,574	30,0	0,467	37,2	0,383	51,0	0,261	78,0	0,096
23,0	0,570	30,2	0,465	37,4	0,382	51,5	0,258	79,0	0,092
23,2	0,567	30,4	0,462	37,6	0,380	52,0	0,254	80,0	0,087
23,4	0,564	30,6	0,460	37,8	0,378	52,5	0,250	81,0	0,082
23,6	0,560	30,8	0,457	38,0	0,375	53,0	0,246	82,0	0,077
23,8	0,557	31,0	0,454	38,2	0,373	53,5	0,243	83,0	0,072
24,0	0,554	31,2	0,452	38,4	0,371	54,0	0,239	84,0	0,068
24,2	0,551	31,4	0,450	38,6	0,369	54,5	0,236	85,0	0,063
24,4	0,547	31,6	0,447	38,8	0,367	55,0	0,232	86,0	0,058
24,6	0,544	31,8	0,445	39,0	0,365	55,5	0,228	87,0	0,054
24,8	0,541	32,0	0,442	39,2	0,363	56,0	0,225	88,0	0,050
25,0	0,538	32,2	0,440	39,4	0,361	56,5	0,221	89,0	0,045
25,2	0,535	32,4	0,437	39,6	0,359	57,0	0,218	90,0	0,041
25,4	0,532	32,6	0,435	39,8	0,358	57,5	0,215	91,0	0,036
25,6	0,529	32,8	0,433	40,0	0,356	58,0	0,211	92,0	0,032
25,8	0,526	33,0	0,430	40,5	0,350	58,5	0,208	93,0	0,028
26,0	0,523	33,2	0,428	41,0	0,346	59,0	0,205	94,0	0,024
26,2	0,520	33,4	0,426	41,5	0,341	59,5	0,202	95,0	0,020
26,4	0,517	33,6	0,423	42,0	0,337	60,0	0,198	96,0	0,016
26,6	0,514	33,8	0,421	42,5	0,332	61,0	0,192	97,0	0,012
26,8	0,511	34,0	0,419	43,0	0,327	62,0	0,186	98,0	0,008
27,0	0,508	34,2	0,416	43,5	0,323	63,0	0,179	99,0	0,004
27,2	0,505	34,4	0,414	44,0	0,319	64,0	0,173	100,0	0,000
27,4	0,502	34,6	0,412	44,5	0,314	65,0	0,167		
27,6	0,498	34,8	0,410	45,0	0,310	66,0	0,161		
27,8	0,497	35,0	0,407	45,5	0,306	67,0	0,156		
28,0	0,494	35,2	0,405	46,0	0,301	68,0	0,150		

Tabelle II.

Aufstellung der den Trommelablesewerten entsprechenden SiO_2-Mengen in mg der vorschriftsmäßig hergestellten Lösung bei einer Schichtdicke von 20 mm unter Vorschaltung des Filters S 61.

D = Ablesewert an der Trommel. A = SiO_2 in mg.

D	A	D	A	D	A	D	A	D	A
2,0	0,759	5,7	0,556	9,4	0,459	13,1	0,394	16,8	0,346
2,1	0,750	5,8	0,553	9,5	0,457	13,2	0,393	16,9	0,345
2,2	0,741	5,9	0,549	9,6	0,455	13,3	0,391	17,0	0,344
2,3	0,732	6,0	0,546	9,7	0,453	13,4	0,390	17,1	0,343
2,4	0,724	6,1	0,543	9,8	0,451	13,5	0,389	17,2	0,341
2,5	0,716	6,2	0,540	9,9	0,449	13,6	0,387	17,3	0,340
2,6	0,708	6,3	0,537	10,0	0,447	13,7	0,386	17,4	0,339
2,7	0,701	6,4	0,534	10,1	0,445	13,8	0,384	17,5	0,338
2,8	0,694	6,5	0,530	10,2	0,443	13,9	0,383	17,6	0,337
2,9	0,687	6,6	0,527	10,3	0,441	14,0	0,382	17,7	0,336
3,0	0,680	6,7	0,525	10,4	0,439	14,1	0,380	17,8	0,335
3,1	0,674	6,8	0,521	10,5	0,437	14,2	0,379	17,9	0,334
3,2	0,668	6,9	0,519	10,6	0,435	14,3	0,377	18,0	0,333
3,3	0,662	7,0	0,516	10,7	0,434	14,4	0,376	18,1	0,332
3,4	0,656	7,1	0,513	10,8	0,432	14,5	0,375	18,2	0,331
3,5	0,651	7,2	0,511	10,9	0,430	14,6	0,373	18,3	0,329
3,6	0,645	7,3	0,508	11,0	0,428	14,7	0,372	18,4	0,328
3,7	0,640	7,4	0,505	11,1	0,427	14,8	0,371	18,5	0,327
3,8	0,634	7,5	0,503	11,2	0,425	14,9	0,369	18,6	0,326
3,9	0,629	7,6	0,500	11,3	0,423	15,0	0,368	18,7	0,325
4,0	0,625	7,7	0,497	11,4	0,421	15,1	0,367	18,8	0,324
4,1	0,620	7,8	0,495	11,5	0,420	15,2	0,366	18,9	0,323
4,2	0,615	7,9	0,492	11,6	0,418	15,3	0,364	19,0	0,322
4,3	0,610	8,0	0,490	11,7	0,416	15,4	0,363	19,1	0,321
4,4	0,606	8,1	0,488	11,8	0,415	15,5	0,362	19,2	0,320
4,5	0,602	8,2	0,485	11,9	0,413	15,6	0,361	19,3	0,319
4,6	0,597	8,3	0,483	12,0	0,411	15,7	0,359	19,4	0,318
4,7	0,593	8,4	0,481	12,1	0,410	15,8	0,358	19,5	0,317
4,8	0,589	8,5	0,478	12,2	0,408	15,9	0,357	19,6	0,316
4,9	0,585	8,6	0,476	12,3	0,407	16,0	0,356	19,7	0,315
5,0	0,581	8,7	0,474	12,4	0,405	16,1	0,354	19,8	0,314
5,1	0,577	8,8	0,472	12,5	0,403	16,2	0,353	19,9	0,313
5,2	0,574	8,9	0,470	12,6	0,402	16,3	0,352	20,0	0,312
5,3	0,570	9,0	0,467	12,7	0,400	16,4	0,351	20,2	0,310
5,4	0,567	9,1	0,465	12,8	0,399	16,5	0,350	20,4	0,308
5,5	0,563	9,2	0,463	12,9	0,397	16,6	0,349	20,6	0,307
5,6	0,559	9,3	0,461	13,0	0,396	16,7	0,347	20,8	0,305

D	A	D	A	D	A	D	A	D	A
21,0	0,303	28,2	0,246	35,4	0,202	46,5	0,149	69,0	0,072
21,2	0,301	28,4	0,244	35,6	0,200	47,0	0,147	70,0	0,069
21,4	0,299	28,6	0,243	35,8	0,199	47,5	0,144	71,0	0,066
21,6	0,297	28,8	0,242	36,0	0,198	48,0	0,142	72,0	0,064
21,8	0,296	29,0	0,240	36,2	0,197	48,5	0,140	73,0	0,061
22,0	0,294	29,2	0,239	36,4	0,196	49,0	0,138	74,0	0,058
22,2	0,292	29,4	0,238	36,6	0,195	49,5	0,136	75,0	0,056
22,4	0,290	29,6	0,236	36,8	0,194	50,0	0,134	76,0	0,053
22,6	0,289	29,8	0,235	37,0	0,193	50,5	0,132	77,0	0,051
22,8	0,287	30,0	0,234	37,2	0,192	51,0	0,131	78,0	0,048
23,0	0,285	30,2	0,232	37,4	0,191	51,5	0,129	79,0	0,045
23,2	0,283	30,4	0,231	37,6	0,190	52,0	0,127	80,0	0,043
23,4	0,282	30,6	0,230	37,8	0,189	52,5	0,125	81,0	0,041
23,6	0,280	30,8	0,228	38,0	0,188	53,0	0,123	82,0	0,038
23,8	0,278	31,0	0,227	38,2	0,187	53,5	0,121	83,0	0,036
24,0	0,277	31,2	0,226	38,4	0,186	54,0	0,120	84,0	0,034
24,2	0,275	31,4	0,225	38,6	0,185	54,5	0,118	85,0	0,032
24,4	0,274	31,6	0,224	38,8	0,184	55,0	0,116	86,0	0,029
24,6	0,272	31,8	0,222	39,0	0,183	55,5	0,114	87,0	0,027
24,8	0,271	32,0	0,221	39,2	0,182	56,0	0,113	83,0	0,025
25,0	0,269	32,2	0,220	39,4	0,181	56,5	0,111	89,0	0,023
25,2	0,267	32,4	0,219	39,6	0,180	57,0	0,109	90,0	0,020
25,4	0,266	32,6	0,218	39,8	0,179	57,5	0,107	91,0	0,018
25,6	0,264	32,8	0,216	40,0	0,178	58,0	0,106	92,0	0,016
25,8	0,263	33,0	0,215	40,5	0,175	58,5	0,104	93,0	0,014
26,0	0,261	33,2	0,214	41,0	0,173	59,0	0,102	94,0	0,012
26,2	0,260	33,4	0,213	41,5	0,171	59,5	0,101	95,0	0,010
26,4	0,258	33,6	0,212	42,0	0,168	60,0	0,099	96,0	0,008
26,6	0,257	33,8	0,210	42,5	0,166	61,0	0,096	97,0	0,006
26,8	0,256	34,0	0,209	43,0	0,164	62,0	0,093	98,0	0,004
27,0	0,254	34,2	0,208	43,5	0,161	63,0	0,090	99,0	0,002
27,2	0,253	34,4	0,207	44,0	0,159	64,0	0,097	100,0	0,000
27,4	0,251	34,6	0,206	44,5	0,157	65,0	0,084		
27,6	0,249	34,8	0,205	45,0	0,155	66,0	0,081		
27,8	0,248	35,0	0,204	45,5	0,153	67,0	0,078		
28,0	0,247	35,2	0,203	46,0	0,151	68,0	0,075		

Schließlich sei noch folgendes bemerkt:

Bei härterem Wasser fallen beim Versetzen der zu färbenden Wasserprobe mit Carbonatsulfit die Härtebildner, z. B. das Calcium als $CaCO_3$ aus. In diesem Falle muß entweder weniger Wasser zur kolorimetrischen Bestimmung verwendet werden oder man entfernt das Calcium noch vor der Bestimmung, indem das zu untersuchende Wasser in der Hitze mit einem möglichst geringen Überschuß von Soda versetzt, abfiltriert, nachgewaschen und neutralisiert wird. Die dadurch verursachte Verdünnung muß selbstverständlich bei der Färbung berücksichtigt und eine größere Menge Flüssigkeit (nicht aber mehr als 30 ccm) verwendet werden.

Die Genauigkeit der Methode ist durch mehrere Analysen reiner Lösungen und natürlicher Wässer nachgewiesen worden. Die Ergebnisse sind in der nächsten (IX.) Mitteilung wiedergegeben.

Zusammenfassung.

Es wird eine neue Methode der Kieselsäurebestimmung im Wasser angegeben und stufenphotometrisch verwertet.

IX. Mitteilung.

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER KIESELSÄURE UND PHOSPHORSÄURE NEBENEINANDER.

In der vorhergehenden Mitteilung wurde bereits die Tatsache erwähnt, daß sowohl die Phosphorsäure als auch die Kieselsäure mit Ammoniummolybdat gelbe Komplexverbindungen bilden, die sich unter Blaufärbung reduzieren lassen. Der Zweck vorliegender Arbeit war nun, einen möglichst einfachen Arbeitsgang auszuarbeiten, der die gleichzeitige Bestimmung beider Säuren, bezw. den störenden Einfluß der einen auf die Bestimmung der anderen auszuschalten gestattet.

Eine Reihe Autoren, die sich mit kolorimetrischen Methoden für Kieselsäurebestimmung befaßt haben, machen auf den störenden Einfluß der Phosphorsäure bei der Kieselsäurebestimmung aufmerksam. Sie suchen ihn dadurch zu beseitigen, daß sie entweder die Phosphorsäure durch Fällung entfernen (z. B. mit Magnesiamixtur u. a.) oder durch Einhalten eines bestimmten p_H-Wertes die Bildung der Phosphormolybdänsäure unterdrücken.

Wir versuchten nun, die schon erwähnte Tatsache auszunützen, daß der Kieselsäurekomplex viel beständiger als der entsprechende Phosphorsäurekomplex ist. Wie bereits angegeben[1], weist die blaue Färbung der reduzierten Phosphormolybdänsäure bei Zimmertemperatur schon nach 30 Minuten eine deutliche Abschwächung der Intensität auf, während die Silikomolybdänsäure bei Zimmertemperatur erst nach zwei bis drei Stunden in ihrer Farbintensität abnimmt. Durch Steigerung der Temperatur ließ sich der zeitliche Ablauf dieser Intensitätsabnahme stark beschleunigen, wobei sich auch in diesem Falle die Kieselsäurefärbung stabiler erwies. In wiederholten Versuchen wurde festgestellt, daß bei 3½ Minuten langem Erwärmen der gefärbten Lösung in einem 25-ccm-Meßkölbchen die Färbung der Phosphorsäure verschwindet, jene der Kieselsäure aber quantitativ bestehen bleibt, wenn das Erwärmen in einem Wasserbad von genau 70° C vorgenommen wird.

Auch hier tritt der Vorteil des Stufenphotometers gegenüber dem Kolorimeter besonders deutlich zutage. Nach der Entfärbung des Phosphormolybdänsäurekomplexes bleibt nämlich eine schwache Gelbfärbung zurück, eine Färbung, die bei Benutzung eines Kolorimeters schon deshalb Schwierigkeiten bereitet, weil die eine Lösung dadurch eine Mischfarbe aufweist. Beim Stufenphotometer aber wird bei jeder Messung zwecks Monochromatisierung und Herstellung optimaler Meßbedingungen ein der zu messenden Flüssigkeit entsprechendes Filter vorgeschaltet, so daß bei der blauen Flüssigkeit durch das rote Filter S 61 der gelbe Addend bei der Messung nicht zum Vorschein kommen kann. Zum Mechanismus der Entfärbung sei noch folgendes bemerkt. In den ersten zwei Minuten des Erwärmens tritt keine merkliche Farbschwächung ein, während in der vierten Minute die Entfärbung besonders rasch stattfindet. Bei vier Minuten langer Erwärmung kann auch schon die Kieselsäurefärbung angegriffen werden, wodurch bei einem geringen SiO_2-Gehalt ein Fehler von einigen Prozenten möglich ist. Deshalb muß sowohl die Erwärmungszeit als auch die Temperatur sehr genau eingehalten werden. Des weiteren ist zu beachten, daß die gefärbte SiO_2-Lösung, wenn sie dem Lichte der Stupholampe ausgesetzt ist, ebenso wie der

[1] Mikrochemie, **XIII**, 201 (1933).

Phosphormolybdänsäurekomplex etwa durch 10 Minuten in der Farbintensität zunimmt, um dann konstant zu bleiben. Alle diese Tatsachen mußten selbstredend in der Meßvorschrift berücksichtigt werden. Die erforderlichen Lösungen sind in der vorhergehenden Mitteilung (siehe dieses Heft, S. 193) bereits angegeben.

Ausführung der Bestimmung:

10 ccm[2] des zu untersuchenden Wassers werden in einen 100-ccm-Meßkolben gebracht, mit 20 ccm destillierten Wassers verdünnt, 5 ccm Molybdänsäure- und darauf 5 ccm Hydrochinonlösung hinzugefügt. Nach Ablauf von fünf Minuten wird mit 32 ccm Car-

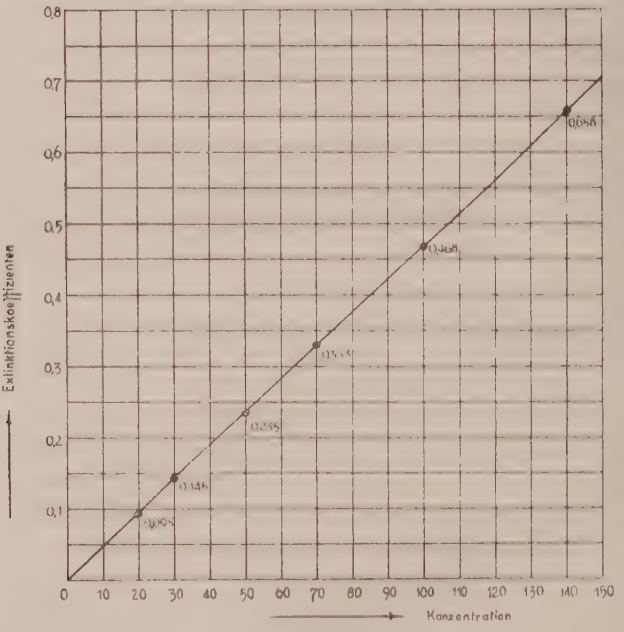


Abb. 1.

Eichkurve der Extinktionskoeffizienten für den SiO_2-Gehalt eines Silikomolybdänsäurekomplexes, erhalten durch Reduktion mit Hydrochinon, wobei 100% einer Konzentration von 0,42 mg% SiO_2 entsprechen.

Filter S 61. Gemessen gegen H_2O.

[2] Die Menge des verwendeten Wassers kann selbstverständlich geändert werden; es muß nur immer mit destilliertem Wasser auf 30 ccm aufgefüllt werden.

bonatsulfitmischung versetzt, bis zur Marke aufgefüllt und durchgemischt. Ein Teil dieser Lösung wird direkt im Stufenphotometer bei einer Schichtdicke von 10 mm unter Vorschaltung des Filters S 61 gemessen, wobei zu beachten ist, daß diese Flüssigkeit in der Küvette vor der Ablesung 10 Minuten lang dem Lichte der Stupholampe ausgesetzt werden muß. Der ermittelte Wert entspricht der Summe der negativen Logarithmen der Durchlässigkeit beider Färbungen. Dieser Wert wird errechnet, indem man den Logarithmus der erhaltenen Ablesung von 2 subtrahiert.

Ein anderer Teil (etwa 25 ccm) der Lösung wird in ein 25-ccm Meßkölbchen in einem bereits auf 70° C vorgewärmten Wasserbad genau 3½ Minuten erwärmt, dann möglichst rasch abgekühlt und, wie oben beschrieben, photometriert. Diese zweite Messung ergibt den der gefärbten Kieselsäurelösung entsprechenden negativen Logarithmus der Durchlässigkeit. Durch Subtraktion beider Werte wird der negative Logarithmus für die Phosphorfärbung ermittelt. Aus den Abbildungen 1 und 2, bezw. Tabellen I, II, III, IV und V können dann die den gefundenen negativen Logarithmen entsprechenden SiO_2-, bezw. P-Konzentrationen entnommen werden.

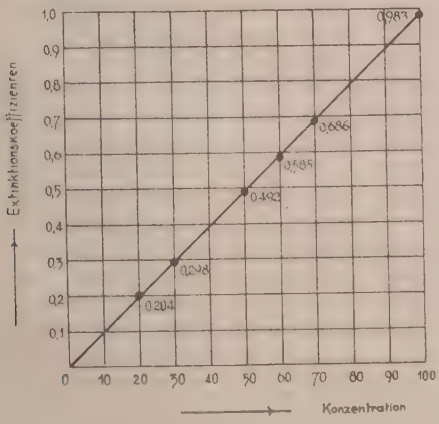


Abb. 2.

Eichkurve der Extinktionskoeffizienten für den Phosphorgehalt eines Molybdänphosphorsäurekomplexes, erhalten durch Reduktion mit Hydrochinon, wobei 100% einer Konzentration von 0,5 mg% Phosphor entsprechen.

Filter S 61. Gemessen gegen H_2O.

Tabelle I.

Anordnung der den negativen Logarithmen der Durchlässigkeiten entsprechenden SiO_2-Mengen in mg der vorschriftsmäßig hergestellten Lösung bei einer Schichtdicke von 10 mm unter Vorschaltung des Filters S 61.

k = negativer Logarithmus der Durchlässigkeit. A = SiO_2 in mg.

k	A	k	A	k	A	k	A	k	A
1,600	1,518	1,244	1,112	1,027	0,918	0,883	0,789	0,775	0,692
1,678	1,500	1,237	1,105	1,022	0,913	0,879	0,786	0,772	0,690
1,658	1,482	1,22[illegible]	1,098	1,018	0,910	0,876	0,783	0,770	0,688
1,638	1,464	1,223	1,092	1,013	0,906	0,873	0,780	0,767	0,685
1,620	1,448	1,215	1,086	1,009	0,902	0,870	0,777	0,765	0,683
1,602	1,432	1,208	1,079	1,004	0,898	0,867	0,774	0,762	0,681
1,585	1,416	1,201	1,073	1,000	0,894	0,863	0,771	0,760	0,678
1,569	1,402	1,194	1,067	0,996	0,890	0,860	0,769	0,757	0,676
1,552	1,388	1,187	1,060	0,991	0,886	0,857	0,766	0,755	0,674
1,538	1,374	1,181	1,054	0,987	0,882	0,854	0,763	0,752	0,672
1,523	1,361	1,174	1,049	0,983	0,878	0,851	0,760	0,750	0,670
1,509	1,349	1,168	1,043	0,979	0,875	0,848	0,758	0,747	0,668
1,495	1,336	1,161	1,037	0,975	0,871	0,845	0,755	0,745	0,666
1,482	1,325	1,155	1,032	0,971	0,867	0,842	0,752	0,742	0,663
1,469	1,313	1,149	1,027	0,967	0,864	0,839	0,749	0,740	0,661
1,456	1,301	1,143	1,021	0,963	0,860	0,836	0,747	0,738	0,658
1,444	1,291	1,137	1,015	0,959	0,857	0,833	0,744	0,735	0,656
1,432	1,280	1,131	1,011	0,955	0,853	0,831	0,741	0,733	0,653
1,420	1,269	1,125	1,005	0,951	0,849	0,827	0,739	0,731	0,651
1,409	1,259	1,119	1,000	0,947	0,846	0,824	0,736	0,728	0,651
1,398	1,249	1,114	0,995	0,943	0,843	0,821	0,734	0,726	0,648
1,387	1,239	1,108	0,990	0,939	0,839	0,818	0,731	0,724	0,647
1,377	1,230	1,102	0,985	0,936	0,836	0,815	0,729	0,721	0,644
1,367	1,221	1,097	0,980	0,932	0,833	0,813	0,726	0,719	0,642
1,357	1,213	1,092	0,975	0,928	0,829	0,810	0,724	0,717	0,640
1,347	1,204	1,086	0,970	0,925	0,826	0,807	0,721	0,714	0,638
1,337	1,195	1,081	0,966	0,921	0,823	0,804	0,719	0,712	0,636
1,328	1,187	1,076	0,962	0,917	0,820	0,801	0,716	0,710	0,634
1,319	1,179	1,071	0,956	0,914	0,816	0,799	0,714	0,708	0,632
1,310	1,170	1,066	0,952	0,910	0,813	0,796	0,711	0,706	0,630
1,301	1,163	1,061	0,948	0,907	0,810	0,793	0,709	0,703	0,628
1,292	1,155	1,056	0,944	0,903	0,807	0,791	0,706	0,701	0,627
1,284	1,147	1,051	0,939	0,900	0,804	0,788	0,704	0,699	0,625
1,276	1,140	1,046	0,935	0,896	0,801	0,785	0,702	0,695	0,621
1,268	1,133	1,041	0,930	0,893	0,798	0,783	0,700	0,690	0,617
1,260	1,126	1,036	0,926	0,889	0,795	0,780	0,697	0,685	0,613
1,252	1,119	1,032	0,922	0,886	0,792	0,777	0,695	0,682	0,609

k	A	k	A	k	A	k	A	k	A
0,678	0,606	0,552	0,494	0.456	0.407	0.347	0.310	0.187	0.167
0,674	0,602	0.550	0,491	0.454	0.405	0.342	0.306	0.181	0.161
0,670	0,598	0.547	0,489	0.451	0.403	0.337	0.301	0.174	0.156
0,666	0.595	0.544	0.486	0.449	0.401	0.333	0.297	0.168	0.150
0,662	0.591	0.541	0,483	0.446	0.399	0.328	0.293	0.161	0.144
0,658	0.588	0.538	0.480	0.444	0.396	0.323	0.289	0.155	0.138
0,654	0.584	0.535	0.478	0.441	0.394	0.319	0.285	0.149	0.133
0,650	0.581	0.532	0,475	0.439	0.392	0.314	0.281	0.143	0.127
0,646	0.577	0.529	0,472	0.437	0.390	0.310	0.277	0.137	0.122
0,642	0.574	0.526	0,470	0.434	0.388	0.305	0.273	0.131	0.117
0,638	0.570	0.523	0.467	0.432	0.386	0.301	0.269	0.125	0.112
0,635	0.567	0.520	0.465	0.430	0.383	0.297	0.265	0.119	0.106
0,631	0.564	0.517	0.462	0.427	0.382	0.292	0.261	0.114	0.101
0,627	0.560	0.514	0.460	0.425	0.380	0.288	0.258	0.108	0.096
0,623	0.557	0.511	0.457	0.423	0.378	0.284	0.254	0.102	0.092
0,620	0.554	0.509	0.454	0.420	0.375	0.280	0.250	0.097	0.087
0,616	0.551	0.506	0,452	0.418	0.373	0.276	0.246	0.092	0.082
0,613	0.547	0.503	0.450	0.416	0.371	0.272	0.243	0.086	0.077
0,609	0.544	0.500	0,447	0.413	0.369	0.268	0.239	0.081	0.072
0,606	0.541	0.498	0.445	0,411	0.367	0.264	0.236	0.076	0.068
0,602	0.538	0.495	0,442	0.409	0.365	0.260	0.232	0.071	0.063
0,599	0.535	0.492	0.440	0.407	0.363	0.256	0.228	0.066	0.058
0,595	0.532	0.490	0.437	0.405	0.361	0.252	0.225	0.061	0.054
0,592	0.529	0.487	0.435	0.402	0.359	0.248	0.221	0.056	0.050
0,588	0.526	0.484	0.433	0.400	0.358	0.244	0.218	0.051	0.045
0,585	0.523	0.482	0.430	0.393	0.356	0.240	0.215	0.046	0.041
0,582	0.520	0.480	0.428	0.393	0.350	0.237	0.211	0.041	0.036
0,578	0.517	0.477	0,426	0.387	0.346	0.233	0.208	0.036	0.032
0,575	0.514	0.474	0.423	0.382	0.341	0.229	0.205	0.032	0.028
0,572	0.511	0,471	0.421	0.377	0.337	0.226	0.202	0.027	0.024
0,569	0.508	0.469	0.419	0.372	0.332	0.222	0.198	0.022	0.020
0,565	0.505	0.466	0.416	0.367	0.327	0.215	0.192	0.018	0.016
0,562	0.502	0.463	0.414	0.362	0.323	0.208	0.186	0.013	0.012
0,559	0.498	0.461	0.412	0.357	0.319	0.201	0.179	0.009	0.008
0,556	0.497	0,458	0.410	0.352	0.314	0.194	0.173	0.004	0.004

Tabelle II.

Aufstellung der den negativen Logarithmen der Durchlässigkeit entsprechenden SiO_2-Mengen in mg der vorschriftsmäßig hergestellten Lösung bei einer Schichtdicke von 20 mm unter Vorschaltung des Filters S 61.

k = negativer Logarithmus der Durchlässigkeit. A = SiO_2 in mg.

k	A	k	A	k	A	k	A	k	A
1.699	0.759	1.244	0,556	1.027	0.459	0,883	0.394	0,775	0,346
1.678	0.750	1.237	0,553	1.022	0.457	0,879	0.393	0.772	0,345
1.658	0.741	1.229	0.549	1.018	0.455	0,876	0.391	0,770	0,344
1.638	0.732	1.222	0.546	1.013	0.453	0.973	0.390	0.767	0,343
1.620	0.724	1.215	0.543	1.009	0.451	0,870	0.389	0,765	0,341
1.602	0.716	1.208	0.540	1.004	0.449	0,867	0.387	0,762	0.340
1.585	0.708	1.201	0.537	1.000	0.447	0,863	0.386	0,760	0,339
1.569	0.701	1.194	0.534	0.996	0.445	0,860	0.384	0.757	0,338
1.552	0.694	1.187	0.530	0.991	0.443	0,857	0.383	0,755	0,337
1.538	0.687	1.181	0.527	0.987	0.441	0,854	0.382	0,752	0,336
1.523	0.680	1.174	0.525	0.983	0.439	0,851	0.380	0,750	0,335
1.509	0.674	1.168	0.521	0.979	0.437	0,848	0.379	0.747	0,334
1.495	0.668	1.161	0.519	0.975	0.435	0.845	0.377	0,745	0,333
1.482	0.662	1.155	0.516	0.971	0.434	0,842	0.376	0.742	0,332
1.469	0.656	1.149	0.513	0.967	0.432	0.839	0.375	0,740	0,331
1.456	0.651	1.143	0.511	0.963	0.430	0.836	0.373	0,738	0,329
1.444	0.645	1.137	0.508	0.959	0.428	0.833	0.372	0.735	0,328
1.432	0.640	1.131	0.505	0.955	0.427	0.830	0.371	0.733	0,327
1.420	0.634	1.125	0.503	0.951	0.425	0.827	0.369	0.731	0,325
1.409	0.629	1.119	0.500	0.947	0.423	0.824	0.368	0.728	0,326
1,398	0.625	1,114	0,497	0,943	0,421	0,821	0,397	0,726	0,325
1,387	0,620	1.108	0.495	0.939	0.420	0.818	0.365	0.724	0,324
1.377	0.615	1.102	0.492	0.936	0.418	0.815	0.364	0.721	0.323
1.367	0.610	1.097	0.490	0.932	0.416	0.813	0.363	0,719	0,322
1.357	0.606	1.092	0.488	0.928	0.415	0.810	0.362	0.717	0,321
1.347	0.602	1.086	0.485	0.925	0.413	0.807	0.361	0.714	0,320
1.337	0,597	1,081	0,483	0,921	0,411	0,904	0,359	0,712	0,319
1.328	0,593	1.076	0.481	0.917	0.410	0.801	0.358	0.710	0,318
1.319	0.589	1.071	0.478	0.914	0.408	0.799	0.357	0.708	0,317
1.310	0.585	1.066	0.476	0.910	0.407	0.796	0.356	0.706	0,316
1.301	0.581	1,061	0,474	0,907	0,405	9,793	0,354	0,703	0,314
1.292	0.577	1.056	0.472	0.903	0.403	0.791	0.353	0.701	0,313
1.284	0.574	1.051	0.470	0.900	0.402	0.788	0.352	0.699	0,312
1.276	0.570	1.046	0.467	0.896	0.400	0.785	0.351	0,695	0,310
1,268	0.567	1.041	0.465	0.893	0.399	0.783	0.350	0.690	0,308
1.260	0.563	1.036	0.463	0.889	0.397	0.780	0.349	0.685	0,307
1.252	0.559	1.032	0.461	0,886	0,396	0,777	0,347	0,682	0,305

k	A	k	A	k	A	k	A	k	A
0,673	0,303	0.552	0.247	0.456	0.204	0.347	0,155	0.187	0.084
0,674	0,301	0.550	0.246	0,454	0.203	0.342	0,153	0,181	0.081
0,670	0.299	0.547	0.244	0.451	0.202	0.337	0,151	0.174	0.078
0,666	0.297	0.544	0.243	0.449	0.200	0.333	0,149	0,168	0.075
0,662	0.296	0.541	0.242	0.446	0.199	0.328	0.147	0,161	0,072
0,658	0.294	0.538	0.240	0.444	0.193	0.323	0,144	0.155	0,069
0,654	0.292	0.535	0.239	0.441	0,197	0.319	0,142	0,149	0.066
0,650	0.290	0.532	0.238	0.439	0.196	0.314	0,140	0,143	0.064
0,646	0.289	0.529	0.236	0.437	0.195	0.310	0,138	0,137	0.061
0,642	0.287	0.526	0.235	0.434	0.194	0.305	0,136	0.131	0,058
0,638	0.285	0.523	0.234	0.432	0.193	0.301	0.134	0,125	0,056
0,635	0.283	0.520	0.232	0.430	0.192	0.297	0,132	0,119	0 053
0,631	0.282	0.517	0.231	0.427	0.191	0.292	0,131	0,114	0,051
0,627	0.280	0.514	0.230	0.425	0.190	0.288	0.129	0,108	0.048
0,623	0,278	0.511	0.228	0.423	0.189	0.284	0,127	0,102	0,046
0,620	0,277	0.509	0.227	0.420	0,188	0.280	0.125	0,097	0,043
0.616	0.275	0 506	0.226	0.418	0.187	0.276	0,123	0,092	0.041
0,613	0,274	0.503	0.225	0.416	0.186	0.272	0,121	0,086	0,038
0,609	0,272	0.500	0.224	0.413	0.185	0.268	0,120	0 081	0,036
0,606	0.271	0,498	0.222	0.411	0,184	0.264	0,118	0,076	0.034
0,602	0.269	0.495	0.221	0,409	0.183	0.260	0.116	0,071	0.032
0.599	0.267	0.492	0.220	0.407	0.182	0.256	0,114	0.066	0,029
0,595	0.266	0.490	0.219	0.405	0.181	0.252	0.113	0,061	0.027
0,592	0.264	0,487	0.218	0.402	0,180	0.248	0.111	0,056	0.025
0,588	0.263	0.484	0.216	0.400	0.179	0.244	0.109	0,051	0,023
0,585	0,261	0.482	0.215	0,398	0.178	0.240	0,107	0,046	0,020
0,582	0.260	0.480	0.214	0.393	0.175	0.237	0,106	0,041	0.018
0,578	0.258	0.477	0,213	0.387	0.173	0.233	0,104	0,036	0,016
0,575	0.257	0.474	0.212	0.382	0.171	0.229	0,102	0.032	0,014
0.572	0,256	0.471	0.210	0.377	0.168	0.226	0,101	0.027	0,012
0.569	0,254	0,469	0.209	0.372	0.166	0.222	0.099	0,022	0,010
0,565	0.253	0,466	0,208	0.367	0.164	0.215	0,096	0,018	0,008
0,562	0.251	0.463	0.207	0,362	0.161	0 208	0,093	0,013	0,006
0.559	0.249	0.461	0.206	0.357	0.159	0.201	0,090	0.009	0.004
0.556	0.248	0.458	0.205	0.352	0.157	0.194	0.087	0.004	0.002

Tabelle III.

Aufstellung der den negativen Logarithmen der Durchlässigkeit entsprechenden P Mengen in mg der vorschriftsmäßig hergestellten Lösung bei einer Schichtdicke von 10 mm unter Vorschaltung des Filters S 61.

k = negativer Logarithmus der Durchlässigkeit. A = P in mg.

k	A	k	A	k	A	k	A	k	A
1.699	0.863	1.241	0.632	1.027	0.522	0.883	0.448	0,775	0.394
1.678	0.852	1.237	0 628	1.022	0,519	0 879	0,447	0,772	0.392
1.653	0.842	1.229	0.624	1.018	0,517	0,876	0,445	0,770	0.391
1.638	0.832	1.222	0,621	1.013	0 515	0,873	0 443	0,767	0.390
1.620	0.823	1.215	0 617	1.009	0 513	0 870	0,442	0,765	0.388
1.602	0.814	1.208	0.614	1.004	0.510	0.867	0.440	0,762	0.387
1.585	0.805	1 201	0,610	1,000	0,508	0.863	0.439	0.760	0.386
1 569	0.797	1,194	0.607	0 996	0,506	0.860	0,437	0,757	0.385
1.552	0,789	1.187	0,603	0.991	0.504	0.857	0.435	0.755	0.383
1.538	0.781	1.181	0 599	0.987	0.501	0.854	0.434	0.752	0 382
1.523	0.774	1.174	0 596	0 983	0.499	0.851	0.432	0.750	0.381
1.509	0.767	1.168	0 593	0,979	0.497	0.848	0,431	0,747	0.380
1.495	0 760	1.161	0.590	0.975	0.495	0.345	0,429	0.745	0.378
1.4 2	0,752	1.155	0.587	0,971	0,493	0.842	0 428	0,742	0,377
1.469	0,745	1.149	0.384	0.967	0.491	0.839	0,426	0,740	0,376
1.456	0,740	1.143	0,581	0,963	0,489	0,836	0,425	0,738	0,375
1.444	0,734	1.137	0 578	0,959	0.487	0.833	0.423	0.735	0.374
1.432	0,728	1.131	0 575	0,955	0.485	0 830	0.422	0.733	0.372
1.420	0.721	1.125	0 572	0,951	0.483	0.827	0.420	0 731	0.371
1.409	0 716	1.119	0 568	0.947	0.481	0.824	0 419	0.728	0.370
1.398	0,710	1.114	0,565	0,943	0.479	0.821	0,417	0,726	0,369
1.387	0.705	1.108	0,563	0.939	0.477	0.818	0.416	0.724	0.368
1 377	0.700	1.102	0,560	0.936	0.475	0.815	0.414	0.721	0.366
1.367	0.694	1.097	0.557	0 932	0,473	0,813	0,413	0.719	0.365
1.357	0.689	1.092	0.554	0 928	0.472	0.810	0,411	0,717	0.364
1.347	0.684	1 086	0,552	0.925	0,470	0.807	0.410	0.714	0.363
1.337	0.679	1.081	0.549	0.921	0 468	0.804	0.409	0.712	0.362
1.328	0.675	1.076	0.547	0.917	0.466	0.801	0.407	0.710	0.361
1 319	0 670	1.071	0.544	0 914	0.464	0 799	0.406	0.708	0.360
1.310	0,666	1.066	0,541	0,910	0.462	0.796	0,404	0,706	0.358
1,301	0 661	1.061	0.539	0,907	0 461	0.793	0,403	0,703	0.357
1.292	0.656	1.056	0.536	0.903	0.459	0.791	0.402	0.701	0.356
1.284	0 652	1.051	0.534	0 900	0 457	0.788	0.400	0.699	0.355
1.276	0.648	1.046	0.531	0.896	0.455	0.785	0.399	0.695	0.353
1.268	0.644	1.041	0.529	0.893	0.454	0.783	0.397	0.690	0.351
1.260	0 640	1.036	0 526	0.889	0.452	0.780	0.396	0.686	0.349
1.252	0.636	1.032	0.524	0 886	0.450	0.777	0.395	0.682	0.346

k	A	k	A	k	A	k	A	k	A
0.678	0.344	0.552	0.281	0.456	0 232	0.347	0.176	0.187	0 095
0 674	0.342	0.550	0.279	0.451	0.230	0,342	0.174	0.181	0 092
0.670	0.340	0.547	0.278	0.451	0,229	0.337	0.171	0.174	0,088
0,666	0,338	0,544	0,276	0,449	0,2.8	0,333	0,169	0,168	0,085
0.662	0.336	0.541	0.275	0.446	0.227	0.328	0.167	0,161	0,082
0.658	0.334	0.538	0.273	0.444	0.225	0.323	0.164	0,155	0 079
0.654	0.332	0.535	0.272	0 441	0,224	0.319	0.162	0.149	0,076
0.650	0.330	0.532	0.270	0 439	0.223	0.314	0.160	0.143	0,073
0.646	0.323	0.529	0.269	0.437	0.222	0.310	0.157	0.137	0 070
0.642	0.326	0.526	0.267	0 434	0.221	0.305	0.155	0.131	0 067
0.638	0.324	0.523	0.266	0.432	0.219	0.301	0.153	0.125	0.064
0,635	0,322	0,520	0,264	0,430	0,218	0,297	0,151	0,119	0,061
0,631	0,320	0,517	0,263	0,427	0,217	0,292	0,149	0,114	0,058
0.627	0.319	0.514	0.261	0.425	0.216	0.288	0,146	0 108	0,055
0.623	0.317	0.511	0.260	0.423	0.215	0.284	0.144	0.102	0,052
0,620	0,315	0,509	0,258	0,420	0,213	0,280	0,142	0 097	0 049
0,616	0,313	0,506	0,257	0,418	0,212	0,276	0,140	0,092	0 046
0.613	0.311	0.503	0.256	0.416	0 211	0.272	0.138	0.086	0.044
0.609	0.309	0.500	0.254	0.413	0.210	0 268	0.136	0.081	0 041
0.606	0.308	0.498	0.253	0.411	0.209	0.264	0.134	0 076	0.039
0.602	0.306	0.495	0.251	0.409	0.208	0.260	0.132	0.071	0,036
0.599	0.304	0.492	0.250	0.407	0.207	0.256	0.130	0.066	0,033
0.595	0.302	0.490	0 249	0.405	0.206	0.252	0.128	0.061	0 031
0.592	0.301	0.487	0.247	0.402	0 204	0.248	0.126	0.056	0,028
0.588	0.299	0.484	0.246	0.400	0.203	0.244	0.124	0.051	0,026
0.585	0.297	0 482	0.245	0.398	0.202	0.240	0.122	0 046	0 023
0,582	0,296	0 480	0,243	0 393	0,199	0,237	0,120	0,041	0,021
0,578	0,294	0,477	0,242	0,387	0,197	0,233	0,118	0.036	0,018
0,575	0,292	0,474	0 241	0,382	0,194	0,229	0,116	0,032	0,016
0,572	0,291	0,471	0,239	0,377	0,191	0,226	0,115	0,027	0,014
0,569	0.289	0.469	0,238	0 372	0.189	0.222	0.113	0.022	0,011
0.565	0.287	0.466	0.237	0.367	0.186	0.215	0.109	0 018	0 009
0.562	0 286	0.463	0,235	0.362	0.184	0.208	0.105	0.013	0,007
0.559	0.284	0.461	0.234	0.357	0.181	0.201	0.102	0.009	0,004
0,556	0.282	0,458	0,233	0,352	0,179	0,194	0.098	0,004	0,002

Tabelle IV.

Aufstellung der den Trommelwerten entsprechenden P-Mengen in mg der vorschriftsmäßig hergestellten Lösung bei einer Schichtdicke von 30 mm unter Vorschaltung des Filters S 61.

D = Ablesewert an der Trommel. A = P in mg.

D	A	D	A	D	A	D	A	D	A
2,0	0,287	5,7	0,210	9,4	0,174	13,1	0,149	16,8	0,131
2,1	0,284	5,8	0,209	9,5	0,173	13,2	0,149	16,9	0,131
2,2	0,280	5,9	0,208	9,6	0,172	13,3	0,148	17,0	0,130
2,3	0,277	6,0	0,207	9,7	0,171	13,4	0,148	17,1	0,130
2,4	0,274	6,1	0,206	9,8	0,171	13,5	0,147	17,2	0,129
2,5	0,271	6,2	0,204	9,9	0,170	13,6	0,147	17,3	0,129
2,6	0,268	6,3	0,203	10,0	0,169	13,7	0,146	17,4	0,128
2,7	0,265	6,4	0,202	10,1	0,168	13,8	0,146	17,5	0,128
2,8	0,263	6,5	0,201	10,2	0,168	13,9	0,145	17,6	0,128
2,9	0,260	6,6	0,200	10,3	0,167	14,0	0,144	17,7	0,127
3,0	0,258	6,7	0,199	10,4	0,166	14,1	0,144	17,8	0,127
3,1	0,255	6,8	0,197	10,5	0,166	14,2	0,143	17,9	0,126
3,2	0,253	6,9	0,196	10,6	0,165	14,3	0,143	18,0	0,126
3,3	0,251	7,0	0,195	10,7	0,164	14,4	0,142	18,1	0,126
3,4	0,248	7,1	0,194	10,8	0,164	14,5	0,142	18,2	0,125
3,5	0,246	7,2	0,193	10,9	0,163	14,6	0,141	18,3	0,125
3,6	0,244	7,3	0,192	11,0	0,162	14,7	0,141	18,4	0,124
3,7	0,242	7,4	0,191	11,1	0,162	14,8	0,140	18,5	0,124
3,8	0,240	7,5	0,190	11,2	0,161	14,9	0,140	18,6	0,124
3,9	0,238	7,6	0,189	11,3	0,160	15,0	0,139	18,7	0,123
4,0	0,237	7,7	0,188	11,4	0,160	15,1	0,139	18,8	0,123
4,1	0,235	7,8	0,187	11,5	0,159	15,2	0,138	18,9	0,122
4,2	0,233	7,9	0,186	11,6	0,158	15,3	0,138	19,0	0,122
4,3	0,231	8,0	0,186	11,7	0,158	15,4	0,137	19,1	0,122
4,4	0,229	8,1	0,185	11,8	0,157	15,5	0,137	19,2	0,121
4,5	0,228	8,2	0,184	11,9	0,156	15,6	0,137	19,3	0,121
4,6	0,226	8,3	0,183	12,0	0,156	15,7	0,136	19,4	0,121
4,7	0,225	8,4	0,182	12,1	0,155	15,8	0,136	19,5	0,120
4,8	0,223	8,5	0,181	12,2	0,155	15,9	0,135	19,6	0,120
4,9	0,222	8,6	0,180	12,3	0,154	16,0	0,135	19,7	0,119
5,0	0,220	8,7	0,179	12,4	0,153	16,1	0,134	19,8	0,119
5,1	0,219	8,8	0,179	12,5	0,153	16,2	0,134	19,9	0,119
5,2	0,217	8,9	0,178	12,6	0,152	16,3	0,133	20,0	0,118
5,3	0,216	9,0	0,177	12,7	0,152	16,4	0,133	20,2	0,118
5,4	0,215	9,1	0,176	12,8	0,151	16,5	0,132	20,4	0,117
5,5	0,213	9,2	0,175	12,9	0,150	16,6	0,132	20,6	0,116
5,6	0,212	9,3	0,174	13,0	0,150	16,7	0,132	20,8	0,115

D	A	D	A	D	A	D	A	D	A
21,0	0,115	28,2	0,093	35,4	0,076	46,5	0,056	69,0	0,027
21,2	0,114	28,4	0,092	35,6	0,076	47,0	0,055	70,0	0,026
21,4	0,113	28,6	0,092	35,8	0,075	47,5	0,055	71,0	0,025
21,6	0,113	28,8	0,091	36,0	0,075	48,0	0,054	72,0	0,024
21,8	0,112	29,0	0,091	36,2	0,075	48,5	0,053	73,0	0,023
22,0	0,111	29,2	0,090	36,4	0,074	49,0	0,052	74,0	0,022
22,2	0,111	29,4	0,090	36,6	0,074	49,5	0,052	75,0	0,021
22,4	0,110	29,6	0,089	36,8	0,073	50,0	0,051	76,0	0,020
22,6	0,109	29,8	0,089	37,0	0,073	50,5	0,050	77,0	0,019
22,8	0,109	30,0	0,088	37,2	0,073	51,0	0,049	78,0	0,018
23,0	0,108	30,2	0,088	37,4	0,072	51,5	0,049	79,0	0,017
23,2	0,107	30,4	0,087	37,6	0,072	52,0	0,048	80,0	0,016
23,4	0,107	30,6	0,087	37,8	0,071	52,5	0,047	81,0	0,015
23,6	0,106	30.8	0,086	38.0	0,071	53,0	0,047	82,0	0,014
23.8	0,105	31,0	0,086	38.2	0,071	53,5	0,046	83,0	0,013
24,0	0,105	31,2	0,086	38,4	0,070	54,0	0,045	84,0	0,013
24,2	0,104	31,4	0,085	38,6	0,070	54,5	0,045	85,0	0,012
24,4	0,104	31,6	0,085	38,8	0,070	55,0	0,044	86,0	0,011
24,6	0,103	31,8	0,084	39,0	0,069	55,5	0,043	87,0	0,010
24,8	0,102	32,0	0,084	39,2	0,069	56,0	0,043	88,0	0,0094
25,0	0,102	32,2	0,083	39,4	0,068	56,5	0,042	89,0	0,0086
25,2	0,101	32,4	0,083	39,6	0,068	57,0	0,041	90,0	0,0077
25,4	0,101	32,6	0,082	39,8	0,068	57,5	0,041	91,0	0,0069
25,6	0,100	32,8	0,082	40,0	0,067	58,0	0,040	92,0	0,0061
25,8	0,100	33,0	0,081	40,5	0,066	58,5	0,039	93,0	0,0053
26,0	0,099	33,2	0,081	41,0	0,065	59,0	0,039	94,0	0,0045
26,2	0,098	33,4	0,081	41,5	0,065	59,5	0,038	95,0	0,0038
26,4	0,098	33,6	0,080	42,0	0,064	60,0	0,037	96,0	0,0030
26,6	0,097	33,8	0,080	42,5	0,063	61,0	0,036	97,0	0,0022
26,8	0,097	34,0	0,079	43,0	0,062	62,0	0,035	98,0	0,0015
27,0	0,096	34,2	0,079	43,5	0,061	63,0	0,034	99,0	0,0007
27,2	0,096	34,4	0,078	44,0	0,060	64,0	0,033	100,0	0
27,4	0,095	34,6	0,078	44,5	0,059	65,0	0,032		
27,6	0,095	34,8	0,078	45,0	0,059	66,0	0,030		
27,8	0,094	35,0	0,077	45,5	0,058	67,0	0,029		
28,0	0,094	35,2	0,077	46,0	0,057	68,0	0,028		

Tabelle V.[3]

Aufstellung der den negativen Logarithmen der Durchlässigkeit entsprechenden P Mengen in mg der vorschriftsmäßig hergestellten Lösung bei einer Schichtdicke von 30 mm unter Vorschaltung des Filters S 61.

k = negativer Logarithmus der Durchlässigkeit. A = P in mg.

k	A	k	A	k	A	k	A	k	A
1.699	0.287	1.244	0.210	1.027	0.174	0.883	0.149	0.775	0.131
1.678	0.284	1.237	0.209	1.022	0.173	0.879	0.149	0.772	0.131
1.658	0.280	1.229	0.208	1.018	0.172	0.876	0.148	0.770	0.130
1.638	0.277	1.222	0.207	1.013	0.171	0.873	0.148	0.767	0.130
1.620	0.274	1.215	0.206	1.009	0.171	0.870	0.147	0.765	0.129
1.602	0.271	1.208	0.204	1.004	0.170	0.867	0.147	0.762	0.129
1.585	0.268	1.201	0.203	1.000	0.169	0.863	0.146	0.760	0.128
1.569	0.265	1.194	0.202	0.996	0.168	0.860	0.146	0.757	0.128
1.552	0.263	1.187	0.201	0.991	0.168	0.857	0.145	0.755	0.128
1.538	0.260	1.181	0.200	0.987	0.167	0.854	0.144	0.752	0.127
1.523	0.258	1.174	0.199	0.983	0.166	0.851	0.144	0.750	0.127
1.509	0.255	1.168	0.197	0.979	0.166	0.848	0.143	0.747	0.126
1.495	0.253	1.161	0.196	0.975	0.165	0.845	0.143	0.745	0.126
1.482	0.251	1.155	0.195	0.971	0.164	0.842	0.142	0.742	0.126
1.490	0.248	1.149	0.194	0.967	0.164	0.839	0.142	0.740	0.125
1.456	0.246	1.143	0.193	0.963	0.163	0.836	0.141	0.738	0.125
1.444	0.244	1.137	0.192	0.959	0.162	0.833	0.141	0.735	0.124
1.432	0.242	1.131	0.191	0.955	0.162	0.830	0.140	0.733	0.124
1.420	0.240	1.125	0.190	0.951	0.161	0.827	0.140	0.731	0.124
1.409	0.238	1.119	0.189	0.947	0.160	0.824	0.139	0.728	0.123
1.398	0.237	1.114	0.188	0.943	0.160	0.821	0.139	0.726	0.123
1.387	0.235	1.108	0.187	0.939	0.159	0.818	0.138	0.724	0.122
1.377	0.233	1.102	0.186	0.936	0.158	0.815	0.138	0.721	0.122
1.367	0.231	1.097	0.186	0.932	0.158	0.813	0.137	0.719	0.122
1.357	0.229	1.092	0.185	0.928	0.157	0.810	0.137	0.717	0.121
1.347	0.228	1.086	0.184	0.925	0.156	0.807	0.137	0.714	0.121
1.337	0.226	1.081	0.183	0.921	0.156	0.804	0.136	0.712	0.121
1.328	0.225	1.076	0.182	0.917	0.155	0.801	0.136	0.710	0.120
1.319	0.223	1.071	0.181	0.914	0.155	0.799	0.135	0.708	0.120
1.310	0.222	1.066	0.180	0.910	0.154	0.796	0.135	0.706	0.119
1.301	0.220	1.061	0.179	0.907	0.153	0.793	0.134	0.703	0.119
1.292	0.219	1.056	0.179	0.903	0.153	0.791	0.134	0.701	0.119
1.284	0.217	1.051	0.178	0.900	0.152	0.788	0.133	0.699	0.118
1.276	0.216	1.046	0.177	0.896	0.152	0.785	0.133	0.695	0.118
1.268	0.215	1.041	0.176	0.893	0.151	0.783	0.132	0.690	0.117
1.260	0.213	1.036	0.175	0.889	0.150	0.780	0.132	0.686	0.116
1.252	0.212	1.032	0.174	0.886	0.150	0.777	0.132	0.682	0.115

[3] Note siehe nächste Seite.

k	A	k	A	k	A	k	A	k	A
0,678	0,115	0,552	0,094	0,456	0,077	0,347	0,059	0,187	0,032
0,674	0,114	0,550	0,093	0,454	0,077	0,342	0,058	0,181	0,030
0,670	0,113	0,547	0,092	0,451	0,076	0,337	0,057	0,174	0,029
0,666	0,113	0,544	0,092	0,449	0,076	0,333	0,056	0,168	0,028
0,662	0,112	0,541	0,091	0,446	0,075	0,328	0,055	0,161	0,027
0,658	0,111	0,538	0,091	0,444	0,075	0,323	0,055	0,155	0,026
0,654	0,111	0,535	0,090	0,441	0,075	0,319	0,054	0,149	0,025
0,650	0,110	0,532	0,090	0,439	0,074	0,314	0,053	0,143	0,024
0,646	0,109	0,529	0,089	0,437	0,074	0,310	0,052	0,137	0,023
0,642	0,109	0,526	0,089	0,434	0,073	0,305	0,052	0,131	0,022
0,638	0,108	0,523	0,088	0,432	0,073	0,301	0,051	0,125	0,021
0,635	0,107	0,520	0,088	0,430	0,073	0,297	0,050	0,119	0,020
0,631	0,107	0,517	0,087	0,427	0,072	0,292	0,049	0,114	0,019
0,627	0,106	0,514	0,087	0,425	0,072	0,288	0,049	0,108	0,018
0,623	0,105	0,511	0,086	0,423	0,071	0,284	0,048	0,102	0,017
0,620	0,105	0,509	0,086	0,420	0,071	0,280	0,047	0,097	0,016
0,616	0,104	0,506	0,086	0,418	0,071	0,276	0,047	0 092	0,015
0,613	0,104	0,503	0,085	0,416	0,070	0,272	0,046	0,086	0,014
0,609	0,103	0,500	0,085	0,413	0,070	0,268	0,045	0,081	0,013
0,606	0,102	0,498	0,084	0,411	0,070	0,264	0,045	0,076	0,013
0,602	0,102	0,495	0,084	0,409	0,069	0,260	0,044	0,071	0,012
0,599	0,101	0,492	0,083	0,407	0,069	0,256	0,043	0,066	0 011
0,595	0,101	0,490	0,083	0,405	0,068	0,252	0,043	0,061	0,010
0,592	0,100	0,487	0,082	0,402	0,068	0,248	0,042	0,056	0,0094
0,588	0,100	0,484	0,082	0,400	0,068	0,244	0,041	0,051	0,0086
0,585	0,099	0,482	0,081	0,398	0,067	0,240	0,041	0,046	0,0077
0,582	0,098	0,480	0,081	0,393	0,066	0,237	0,040	0,041	0,0069
0,578	0,098	0,477	0,081	0,387	0,065	0,233	0,039	0,036	0,0061
0,575	0,097	0,474	0,080	0,382	0,065	0,229	0,039	0,032	0,0053
0,572	0,097	0,471	0,080	0,377	0,064	0,226	0,038	0,027	0,0045
0,569	0,096	0,469	0,079	0,372	0,063	0,222	0,037	0,022	0,0038
0,565	0,096	0,466	0,079	0,367	0,062	0,215	0,036	0,018	0,0030
0,562	0,095	0,463	0,078	0,362	0,061	0,208	0,035	0,013	0,0022
0,559	0,095	0,461	0,078	0,357	0,060	0,201	0,034	0,009	0,0015
0,556	0,094	0,458	0,078	0,352	0,059	0,194	0,033	0,004	0,0007

[3] Diese Tabelle wurde mit Rücksicht auf eine praktische Neuerung am Stufenphotometer beigefügt. Die Firma Zeiß liefert nämlich seit jüngster Zeit auf Wunsch statt der üblichen Meßtrommeln (Skalateilung direkter Ablesewerte) auch Meßtrommeln mit einer Skalateilung negativer Logarithmen der Durchlässigkeit. Besitzer derart ausgestatteter Apparaturen verwenden daher mit Vorteil statt der Tabelle IV die vorliegende Tabelle V.

Folgende Tabelle zeigt die Genauigkeit der Methode.

Tabelle VI.

Verwendet mg		Gefunden mg		Fehler in %	
P	SiO_2	P	SiO_2	P	SiO_2
0,200	0,210	0,201	0,214	+ 0,5	+ 2,0
0,400	0,168	0,390	0,170	— 2,5	+ 1,2
0,300	0,294	0,295	0,298	— 1,7	+ 1,4
0,100	0,042	0,099	0,043	— 1,0	+ 1,6
0,350	0,252	0,353	0,252	+ 0,8	+ 0,1
0,060	0,202	0,061	0,194	+ 1,6	— 3,5
0,040	0,134	0,039	0,131	— 2,5	— 2,0
0,065	0,336	0,066	0,332	+ 1,5	— 1,3
0,060	0,202	0,058	0,198	— 3,4	— 2,0
0,050	0,252	0,051	0,247	+ 2,0	— 2,0

Zur Ausführung der Bestimmung sei noch bemerkt:

Wenn der Phosphorgehalt der gefärbten Lösung 0,2 mg% nicht übersteigt (was im Wasser gewöhnlich der Fall sein wird), empfiehlt es sich, nur drei Minuten lang zu erwärmen. Ist der Phosphorgehalt viel größer als der Gehalt an Kieselsäure, so wird die zu untersuchende Wasserprobe mit einer abgemessenen Menge einer gestellten Natriumsilikatlösung versetzt, die so berechnet ist, daß die SiO_2-Konzentration in das in den Abbildungen 2 und 3 (Mitlg. VIII, s. dieses Heft, S. 191, 192) angegebene optimale Gebiet fällt. (Nötigenfalls ist das Wasser nach Zugabe der Silikatlösung zu verdünnen.)

Es sei noch darauf hingewiesen, daß eine eventuelle Abgabe der Kieselsäure durch Glasgefäße — die bei 5 Minuten langem Kochen etwa 0,2 mg betragen kann — bei unserem Verfahren nicht in Betracht kommt. Diesbezügliche Versuche zeigten, daß auch bei 5 Minuten langem Erwärmen unter 70° C keine faßbaren Mengen von SiO_2 vom Glase abgegeben werden.

Eine noch einfachere Arbeitsvorschrift konnte auf Grund der

in der Arbeit von Ernst Tschopp und Emilio Tschopp[4] angeführten Angaben über das Verhalten der Kiesel- und Phosphorsäure aufgestellt werden. Es handelt sich um das Verhalten dieser Säuren Ammoniummolybdat gegenüber in Anwesenheit von Oxalsäure, Zitronensäure, Weinsäure und Na-bisulfit.

Die quantitative Bestimmung des Phosphations ist nach Angaben dieser Autoren nur dann möglich, wenn „weniger als 30 mg Ammoniumoxalat oder 50 mg Natriumzitrat oder 50 mg Weinsäure in der zu untersuchenden Lösung zugegen sind. So bildet sich bei Gegenwart von Oxalsäure die Molybdänoxalsäure, die nach A. Rosenheim[5] und R. Weinland[6] etwa die Zusammensetzung $H_2C_2O_4 . MoO_3$ haben dürfte. Die Komplexbeständigkeit dieser Säure ist nach F. Feigl größer als die der Phosphor- oder Arsenmolybdänsäure; daher erfolgt auf Zusatz von Oxalsäure zu gelben Lösungen der Phosphor- oder Arsenmolybdänsäure eine momentane Entfärbung". Bei weiterem Zusatz eines Reduktionsmittels entsteht keine Blaufärbung. „Da die Heteropolysäure der Molybdänoxalsäure aber weniger beständig ist als die Silikomolybdänsäure, so wird auf Zusatz von überschüssiger Oxalsäure letztere nach Feigl nicht zerlegt. Wird umgekehrt genügend Bisulfit vor dem Zusatz der Molybdänsäure zugefügt, so wird dadurch die Bildung von Siliko-, bezw. Arsenmolybdänsäure verhindert, dagegen erleidet die Phosphormolybdänsäure durch den Bisulfitzusatz keinerlei Einbuße. Man kann somit auf diese Art bequem sowohl die lösliche Kieselsäure neben Phosphat- und Arseniationen als auch das Phosphation neben Kieselsäure und Arseniationen quantitativ bestimmen."

Da die Angaben über die Mengen von Oxalsäure, bezw. Natriumbisulfit, welche notwendig sind, um die Phosphor-, bezw. die Kieselsäure der Färbung zu entziehen, keineswegs ohne weiteres auf unsere Bestimmungsmethode dieser Säuren übertragen werden konnten, wurden erst entsprechende Versuche angesetzt. Es zeigte sich nun, daß 5 ccm einer 4%igen Oxalsäurelösung ausreichen, um 0,5 mg Phosphor der Reaktion mit Molybdänsäure zu entziehen.

[4] Helv. chim Acta, **XV**, 793 (1932).

[5] Ztschr. anorg. Chem., **4**, 352 (1893); **34**, 427 (1903).

[6] Ztschr. anorg. Chem., **108**, 248 (1919).

Dieser maximale Konzentrationsbereich wurde von uns bereits für die Phosphorbestimmung im Wasser ausgearbeitet. Die Oxalsäure wurde der Phosphorsäurelösung erst nach Zugabe des Ammoniummolybdats zugesetzt, wobei eine vollkommene Entfärbung der gelben Lösung und keine Blaufärbung bei Zusatz von Hydrochinon eintrat. Es wurde eine ganze Reihe von gestellten Lösungen von Phosphor- und Kieselsäure auf diese Weise, das heißt unter Zusatz von Oxalsäure, gefärbt und gemessen. Sie ergaben richtige Werte für die Kieselsäure.

Demzufolge wird eine Kieselsäurebestimmung in Anwesenheit von Phosphorsäure folgendermaßen ausgeführt:

An Reagenzien ist außer der in der Mitteilung VIII für die SiO_2-Bestimmung vorgeschriebenen Lösungen noch eine 4%ige Oxalsäurelösung erforderlich.

5 bis 30 cm^3 des zu untersuchenden Wassers werden in einen 100-ccm-Meßkolben gebracht, mit 5 ccm Molybdänsäurelösung versetzt und 1 bis 2 Minuten stehengelassen. Dann werden 5 ccm der Oxalsäurelösung zugesetzt[8], durchgemischt und 5 ccm Hydrochinon hinzugefügt. Nun wird 5 Minuten stehengelassen, 32 ccm Carbonatsulfitmischung hinzugesetzt, auf 100 ccm aufgefüllt und wie üblich photometriert. Vor dem Ablesen muß die Lösung in der Küvette 10 Minuten lang dem Lichte der Stupholampe ausgesetzt werden. Der der Ablesung entsprechende Kieselsäurewert wird den in der VIII. Mitteilung angegebenen Tabellen I und II entnommen. Folgende Tabelle zeigt die Genauigkeit dieser Methode.

[7] Siehe Fußnote auf Seite 200.

[8] Der gelbe Kieselsäuremolybdänkomplex bildet sich langsamer als der der Phosphorsäure. Es muß deshalb etwa eine Minute gewartet werden, bis das Ammoniummolybdat die ganze Kieselsäure bindet. Wenn man diesen Umstand nicht beachtet und die Oxalsäure sofort zusetzt, so kann man zu niedrige Werte erhalten. Bei der Kieselsäurebestimmung darf also die Oxalsäure nicht zugegen sein, bevor der Kieselsäuremolybdänkomplex, den sie nicht zerstören kann, sich gebildet hat. Bei sehr langem Stehen nach Zugabe der Oxalsäure kann ebenfalls geschehen, daß zu niedrige Werte erhalten werden; wahrscheinlich, weil bei diesen Bedingungen auch der Kieselsäuremolybdänkomplex durch die Oxalsäure angegriffen wird.

Bei härteren Wässern müssen die Härtebildner vor dem Färben entfernt werden (siehe VIII. Mitteilung, S. 198).

Tabelle VII.

Nr.	Art und Menge des Wassers	Das Wasser enthält	Zugegeben in mg		Insgesamt vorhanden	Gefunden
		SiO_2 in mg	SiO_2	P	SiO_2	
1	Leitungswasser	0.090	0.210	0.250	0.300	0.298
2	10 ccm	0.090	0.126	0.150	0.216	0.214
3	Brunnenwasser I	0.189	0.084	0.100	0.273	0.274
4	10 ccm	0.189	0.252	0.300	0.441	0.435
5	Moldauwasser	0.023	0.126	0.150	0.149	0.149
6	25 ccm	0.023	0.084	0.100	0.107	0.109
7	Brunnenwasser II	0,119	0.042	0,050	0,161	0,159
8	10 ccm	0.119	0.084	0.100	0.203	0.202
9	Brunnenwasser III 10 ccm	0,129	0,189	0,225	0,318	0,316
10	Brunnenwasser IV 10 ccm	0.155	0.126	0.150	0.281	0,282
11	Brunnenwasser V	0.191	0.063	0.075	0.254	0,252
12	10 ccm	0,191	0,084	0,100	0,275	0,271

Um die Phosphorsäure in Anwesenheit von Kieselsäure zu bestimmen, ist außer den in der VIII. Mitteilung angegebenen Reagenzien noch eine 7%ige Natriumbisulfitlösung erforderlich. 50 ccm Wasser werden auf etwa 20 ccm eingedampft[9], in einen 100-ccm-Kolben hineingebracht (Gesamtvolumen maximal 30 ccm),

[9] Bei der Vermutung, daß Phosphor im Wasser in organischer Form vorhanden ist, wird der Aufschluß folgendermaßen durchgeführt: Das eingedampfte Wasser wird in einen Kjeldahl-Kolben gebracht und mit 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure, 1 ccm konzentrierter Salpetersäure sowie mit einem Quarzkörnchen versetzt. Der Kolben wird vorsichtig erhitzt, und zwar solange, bis braune Dämpfe zu entweichen beginnen. Keinesfalls darf zur Trockene eingedampft werden und eine Überhitzung der Wandung eintreten. Das Veraschungsgemisch wird mit etwa 10 ccm destillierten Wassers aufgekocht, durch ein gehärtetes Filter (Schleicher & Schüll, Nr. 575, 7 cm Durchmesser) in einen 100-ccm-Meßkolben filtriert, nachgewaschen, neutralisiert und, wie vorgeschrieben, gefärbt.

5 ccm der Bisulfitlösung[10] zugesetzt, gut durchgemischt, dann 5 ccm Molybdänsäure- und 5 ccm Hydrochinonlösung dazugegeben und 5 Minuten stehengelassen. Darauf werden 32 ccm der Carbonatsulfitmischung zugefügt, bis zur Marke aufgefüllt, wieder durchgemischt und wie oben photometriert. Zur Ermittlung des gesuchten Phosphorwertes dienen die Tabellen IV und V.

Tabelle VIII bestätigt die Genauigkeit dieser Methode der Phosphorbestimmung in Anwesenheit von Kieselsäure.

Tabelle VIII.

Probe	100 ccm Wasser enthalten		Zugegeben	Berechnet	Gefunden
	mg P	mg SiO_2	mg P	mg P	mg P
Leitungswasser	0,004	0,900	0,200	0,204	0,208
Moldauwasser	0,004	0,185	0,050	0,054	0,052
Brunnenwasser I	0,008	1,890	0,100	0,108	0,094
Brunnenwasser II	0,013	1,200	0,100	0,113	0,104
Brunnenwasser III	0,009	1,560	0,075	0,084	0,076

Auch hier können infolge allzu hoher Härte des Wassers die Härtebildner beim Versetzen der gefärbten Lösung mit Carbonatsulfit ausfallen. Wenn man zwecks Mitbestimmung des organischen Phosphors den oben erwähnten Aufschluß durchführen will, so empfiehlt es sich, das Calcium v o r dem Aufschluß als Calciumoxalat in essigsaurer Lösung zu fällen. Wenn man aber auf die Bestimmung des organischen Phosphors verzichten kann und somit der Aufschluß entfällt, dann verwendet man, um das Ausfallen der Härtebildner zu vermeiden, weniger Wasser zur Färbung.

Die Frage nach der Natur der in den natürlichen Wässern vorkommenden Kieselsäure kann nach den Untersuchungen von R. Stumper[11] als gelöst betrachtet werden. Der weitaus größte Teil der Kieselsäure ist im Wasser molekular gelöst; der kolloide Anteil

[10] Diese Menge erwies sich als genügend, um 0,42 mg SiO_2 der Reaktion mit Molybdänsäure zu entziehen. Die verwendete Menge Wasser soll also nicht mehr als 0,42 mg SiO_2 enthalten.

[11] Die Wärme, **55**, 272 (1932).

ist sehr gering. Es wird weiter behauptet (OHLMÜLLER-SPITTA[12] F. DIÉNERT und A. WANDERBULCKE[13]), daß die kolloide Kieselsäure kolorimetrisch nicht nachgewiesen werden kann. Bei unseren Versuchen konnten wir folgende Feststellung machen:

Eine frisch dargestellte Natriumsilikatlösung, erhalten durch Verdünnen einer sehr konzentrierten, zeigte einen zu niedrigen Wert. Der richtige Wert und somit Konstanz tritt erst nach einigen Tagen ein. Dies besagt, daß die unmittelbar nach dem Verdünnen in der Lösung noch vorhandene kolloide Kieselsäure, bezw. hochmolekulare Komplexe an der Reaktion mit Ammoniummolybdat nicht teilnehmen; mit der zeitlichen Veränderung, die in einer Peptisation, bezw. in einer Verkleinerung der Kieselsäurekomplexe besteht, wächst die an der Reaktion sich beteiligende Kieselsäuremenge.

Zusammenfasssung.

Es wurden stufenphotometrische Methoden zur Bestimmung der Phosphor- und Kieselsäure im Wasser ausgearbeitet, die als Grundlage die Bildung blauer Komplexe der reduzierten Phosphormolybdän-, bezw. Silikomolybdänsäure aufweisen.

1. Es wurde festgestellt, daß der reduzierte Phosphormolybdänsäurekomplex weniger beständig ist als der Silikomolybdänsäurekomplex. Durch 3½ Minuten langes Erwärmen am Wasserbade von 70° C verschwindet die Blaufärbung des Phosphormolybdänsäurekomplexes, während jene des Silikomolybdänsäurekomplexes zurückbleibt. Diese Tatsache ermöglicht eine bequeme Bestimmung beider Säuren in einem Arbeitsgang.

2. In Anlehnung auf die Arbeit von E. TSCHOPP und E. TSCHOPP wurden zwei Methoden ausgearbeitet:

a) Die eine ermöglicht die Bestimmung der Kieselsäure in Anwesenheit der Phosphorsäure, indem der gelbe Phosphorsäure-

[12] Untersuchung und Beurteilung des Wassers und Abwassers, 5. Aufl., S. 126. Berlin 1931.

[13] Compt. rend. Acad. Sciences, **176**, 1478 (1923).

molybdänkomplex durch Zugabe von 5 ccm einer 4%igen Oxalsäurelösung zerstört wird.

b) Die zweite Methode ermöglicht die Bestimmung der Phosphorsäure in Gegenwart von Kieselsäure. Es wird nämlich vor dem Zusatz der Molybdänsäure 5 ccm einer 7%igen Natriumbisulfitlösung zugefügt; dadurch wird die Bildung von Silikomolybdänsäure, nicht aber von Phosphormolybdänsäure verhindert.

Neues Zubehör zu einem „Mikroskop für mikrochemische Arbeiten“ (Kapillarhalter, mikrochemischer Manipulator), nebst einigen Bemerkungen zur qualitativen Mikroelektrolyse.

Von

Herbert Alber.

(Eingelangt am 14. September 1933.)

Aus der Entwicklung der Mikrochemie in den letzten Jahren läßt sich deutlich das Bestreben erkennen, einerseits das vorhandene, schon recht umfangreich gewordene Material zu sichten und kritisch zu überprüfen, anderseits die allgemeine Verbreitung der als gut befundenen Methoden zu fördern, wobei auf die Ausarbeitung möglichst einfacher apparativer Hilfsmittel zur Einführung der Methoden in alle Zweige der angewandten Chemie und physikalisch-chemischen Forschung besonderes Augenmerk gerichtet ist. Heute gehört ja die Mikrochemie zum unumstritten notwendigen Rüstzeug des Naturwissenschaftlers, und dem chemischen Nachwuchs muß deshalb so viel als möglich Gelegenheit geboten werden, sich mit den Mikromethoden vertraut machen zu können. Neben der an einzelnen Hochschulen selbst betriebenen Lehrtätigkeit von Dozenten hat man in der letzten Zeit noch einen anderen Weg beschritten, nämlich durch eine Art von Wanderunterricht[1] einer größeren Anzahl von Interessenten und Studierenden bestimmte Gebiete der Mikroanalyse theoretisch und praktisch zugänglich zu machen.

Aus den Erfahrungen, die man anläßlich von Unterrichtskursen in der mikroanalytischen Praxis sammelt, geht hervor, daß

[1] Vgl. Mikrochemie, **XII**, 280, 403 (1932/33).

der Anfänger — gemeint ist natürlich der Anfänger auf mikrochemischem Gebiete — manchmal Mißtrauen zu einer an sich ausgezeichneten Methode faßt und den Fehler lieber bei der Methode als bei sich selbst sucht. Der nachhaltende Erfolg der erwähnten Kurse wird aber gerade durch solche Vorkommnisse sehr in Frage gestellt. Weiters wird von Fachleuten, die aus der Industrie kommen, mit Rücksicht auf die in Werkslaboratorien vielfach übliche Laborantentätigkeit immer der Wunsch geäußert, solchen Methoden den Vorzug zu geben, die an die persönliche Geschicklichkeit des Arbeitenden möglichst geringe Anforderungen stellen oder deren Beherrschung durch die Anwendung von apparativen Hilfsmitteln weitestgehend erleichtert wird.

Wenn wir nunmehr ein spezielleres Beispiel in den Kreis unserer Betrachtungen ziehen, so wäre auf die von É. M. Chamot[2] mit „chemischer Mikroskopie" bezeichnete Arbeitsrichtung hinzuweisen, die einen sehr großen Teil dessen beinhaltet, was wir heute allgemein unter „Mikrochemie" verstehen. Es ist ja einleuchtend, daß man das Mikroskop zu Hilfe nehmen wird oder es verwenden muß, wenn man mit Substanzmengen in der Größenordnung von einigen γ oder weniger manipulieren will.

Ausgehend von diesen Anregungen und Erwägungen und unter besonderer Berücksichtigung der von F. Emich in seinen Werken geschilderten Arbeitsmethoden[3] sind einige Apparate entwickelt worden, mit denen ich einen ersten kleinen Beitrag zu einem „Mikroskop für mikrochemische Arbeiten" bringen will, welches einen möglichst großen und verschiedenartigen Anwendungsbereich umfassen, also nicht nur feinstes Beobachtungsinstrument bei starken Vergrößerungen, sondern auch Präparierstativ bei schwachen Vergrößerungen sein soll. Ich möchte es sehr wünschen, daß dieses Instrument seinen gedachten Zweck

[2] É. M. Chamot und C. W. Mason, Handbook of Chemical Microscopy. New York; Vol. I. (1930); Vol. II. (1931).

[3] F. Emich, Lehrbuch der Mikrochemie, II. Auflage, München 1926 (im folgenden mit „I." bezeichnet); Mikrochemisches Praktikum, II. Auflage, München 1931 (im folgenden mit „II." bezeichnet). Vortrag: „Über Mikrochemie", Mikrochemie, X, 205 (1931/32); Ztschr. angew. Chem., 44, 725 (1931). Vgl. die umfassende Übersicht über die anorganischen Methoden der Mikrochemie in der Broschüre: Mikrokemi (schwedisch) von H. Alber, Svenska Bokförlaget, Stockholm 1933.

als Kursmikroskop und als Universalinstrument für jeden erfüllt, der sich ganz allgemein mit den qualitativen Mikromethoden vertraut machen will, und daß es darüber hinaus die Arbeiten von Spezialisten in den verschiedenen Gebieten der angewandten Mikrochemie erleichtern und so vielleicht zur Lösung von Problemen beitragen möge, die sonst nicht in Angriff genommen worden wären.

I. Allgemeines.

Bezüglich der Ausrüstung solcher für die mikroskopische und mikrochemische Analyse geeigneter Instrumente sei auf einige Literaturstellen verwiesen[4]. Bei den hier beschriebenen Versuchen ließ ich mich von dem Gedanken leiten, zu einem einzelnen, schon vorhandenen Mikroskopstativ solche Zusatzteile für spezielle Zwecke zu schaffen, die leicht zu befestigen und rasch auszuwechseln sind. Neben einer Verringerung der Anschaffungskosten erlangt man auch den Vorteil, daß den momentanen Bedürfnissen bei der Auswahl der Zusatzbestandteile weitester Spielraum gelassen ist. Von einer gesonderten Anordnung der Zusatzteile (wie bei den Mikromanipulatoren) wurde vorläufig abgesehen. Zur Verwendung gelangten ein mineralogisches Laboratoriumsmikroskop M III und — für eine billigere Ausrüstung bestimmt — ein Mikroskop für praktische Ärzte R D der Firma Optische Werke C. Reichert, Wien, die durch die Ausstattung mit den entsprechenden Zusatzbestandteilen zu dem Mikroskop für mikrochemische Arbeiten umgestaltet wurden.

An den Instrumenten anderer optischer Firmen ist das neue Zubehör ohne größere Schwierigkeiten anzubringen.

Einige allgemeine Gesichtspunkte, die beim mikroskopischen Arbeiten, besonders beim Manipulieren mit kleinen Substanzmengen von Bedeutung sind, seien hier, obwohl sie schon teilweise an anderen Stellen in der Literatur zu finden sind, hervorgehoben, weil sie sich neuerlich wieder bewährt haben.

---

[4] F. Emich, l. c.; I. S. 11, II. S. 5, 147. É. M. Chamot und C. W. Mason, l. c.; I. S. 51. Vgl. auch das Sammelreferat von A. Benedetti-Pichler, Mikrochemie, III, 120 (1925); in Klein-Strebinger, Fortschritte der Mikrochemie. Leipzig und Wien 1928, S. 138 ff.; Ztschr. analyt. Chem., 74, 192 ff. (1928).

Bei den mikrochemischen Versuchen wird im auffallenden und im durchfallenden Lichte gearbeitet und ein möglichst rascher, bequem zu bewerkstelligender Wechsel der Beleuchtungsart ist unbedingt notwendig; nicht immer jedoch steht ein guter Fensterplatz und Tageslicht zur Verfügung. Zweierlei Arten künstlicher Beleuchtungsanordnungen sind entsprechend, einfach und angenehm in der Handhabung: a) An einem kleinen Stativ wird ein leichtes Gehäuse (mit Schlitz für Filter und Kondensor) für ein Niedervoltlämpchen[5] angebracht; dieses Gehäuse ist in lotrechter Richtung verschiebbar, festzuklemmen und um eine waagrechte Achse neigbar, um rasch von der direkten Beleuchtung bei auffallendem Lichte in die indirekte Beleuchtung mittels des Spiegels bei durchfallendem Lichte überzugehen. b) Es wird am unteren Ende des Mikroskoptubus eine Schlittenführung angebracht, mit deren Hilfe der Revolver mit den Objektiven gegen einen Vertikalilluminator mit zwei Griffen auszutauschen ist[6]. In beiden Fällen ist es unter Umständen vorteilhaft, durch Einschalten von Farbfiltern (z. B. blau, rot, grün, gelb und [mattiert] weiß) über Licht von verschiedenen Wellenlängen zu verfügen und bei der Auflichtbeleuchtung durch ein wärmeabsorbierendes Filter eine Überhitzung der mikroskopischen Präparate hintanzuhalten. Durch entsprechende Wahl des Farbfilters wird das Hervortreten oder Verschwinden von speziellen Details der untersuchten Objekte sehr begünstigt, ebenso durch farbigen Untergrund bei der Auflichtbeleuchtung. Einen weißen Untergrund erzeugt man sich z. B. durch Überstülpen eines in Metall gefaßten weißen Zelluloid- oder Porzellanplättchens (weiße Kappe) über den ausklappbaren Teil des Kondensors, wobei dieser etwas gesenkt wird, um die Bildung von Schlagschatten zu vermeiden; in ähnlicher Weise können verschiedenfarbige Plättchen in die Metallfassung eingesetzt werden. Ein dunkler Untergrund kommt durch Schließen der Irisblende (oder eventuell durch eine schwarze Kappe) zustande.

Der Kondensor mit der Irisblende und der Polarisator sollen

[5] Dieses Lämpchen, das auch in den Vertikalilluminator paßt, ist über einen Regulierwiderstand an die Netzleitung angeschlossen.

[6] Diese zweite Art eignet sich besonders für Demonstrationen und Projektion.

leicht ausschaltbar sein, entweder durch Herausschwenken aus der optischen Achse um eine seitliche Schraube oder durch vollständiges Entfernen aus der Befestigungsvorrichtung, um Gegenstände auch unterhalb des Objekttisches zur Beobachtung in die optische Achse des Mikroskops zu bringen.

Ein wesentlicher Punkt bei allen Manipulationen unter dem Mikroskop ist schließlich der sichere Schutz der empfindlichen Objektive gegenüber mechanischen Beschädigungen oder aggressiven Dämpfen (HF!). Zweckmäßig sind z. B. die Anordnungen von É. M. Chamot und H. J. Cole[7] oder P. D. C. Kley[8], bei denen die das Objektiv schützenden Deckgläschen leicht auszuwechseln sind.

Eine Vorstellung von dem Aussehen einzelner hier erwähnter Bestandteile soll Figur 1 vermitteln.

II. Kapillarhalter.

Das „Arbeiten im ausgezogenen Röhrchen" nach F. Emich[9] bietet dem Mikrochemiker so mannigfaltige Möglichkeiten, daß er in vielen Fällen gern auf diese Methodik zurückgreifen wird. Es ist dann wünschenswert, die Identifizierung des Endproduktes im ausgezogenen Röhrchen (hier kurz Kapillare genannt) selbst vorzunehmen. Da durch den Ausbau der Tüpfelmethoden[10] eine Reihe von spezifischen Nachweisen durch Farbreaktionen zur Verfügung steht, dürfte das Verfahren der Prüfung auf schwache Färbungen mittels axialer Durchleuchtung in der Kapillare größerem Interesse begegnen. Um so mehr, als es nicht nur in den normalen qualitativen Analysengang einzuschalten ist, sondern auch beim Vergleich von Färbungen (für pH-Messungen, für mikrokolorimetrische Versuche[11] usw.) Verwendung finden dürfte.

Wesentlich für ein gutes Gelingen der Reaktionen ist die lotrechte Stellung der verschieden dimensionierten Kapillaren

[7] Mikrochemie, IV, 101 (1926).

[8] Vgl. die Kataloge der Optischen Werke C. Reichert, Wien.

[9] l. c.; I. S. 44, 63. Vgl. auch die Zentrifugierkapillaren von F. L. Hahn. Mikrochemie, Pregl-Festband, 127 (1929).

[10] F. Feigl, Qualitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktionen, Leipzig 1931.

[11] Vgl. z. B. É. M. Chamot und C. W. Mason, l. c.; I. S. 189.

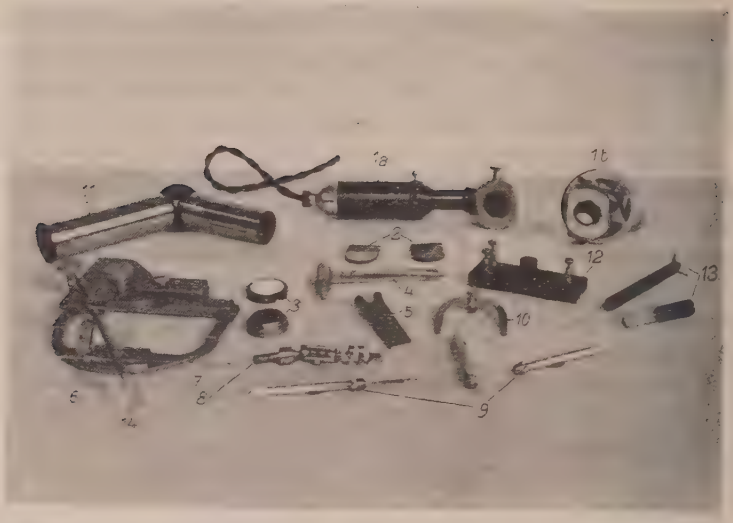


Fig. 1.

Zubehör zum Mikroskop für mikrochemische Arbeiten (Optische Werke C. Reichert).

Ziffernerklärung:

1a = Vertikalilluminator mit Schlittenführung.
1b = Objektivrevolver mit Schlittenführung.
2 = Farbiges und wärmeabsorbierendes Filter.
3 = Weiße und schwarze Kappe (Untergrund).
4 = Kapillarhalter.
5 = Schlüssel zur Nachjustierung des Kapillarhalters.
6 = Mikrochemischer Manipulator auf
7 = speziellem Objektführer f. Feinverschiebungen.
8 = Mikrochemischer Manipulator mit Stift.
9 = Nadelhalter für drei Größen.
10 = U-förmige Präparatklemme für 7 und 12.
11 = Schrägblickaufsatz mit Bildaufrichtung.
12 = Elektrolytischer Objektträger.
13 = Nadelelektrode mit Schutzkappe.
14 = Halter mit federnder Backe für längere Gegenstände.

in der optischen Achse des Mikroskops, eine gute optische Verbindung mit der Unterlage (Flüssigkeitstropfen) und eine möglichst ebene Oberfläche der zu prüfenden Flüssigkeit[12]. Die Versuchstechnik mit dem Wachsklötzchen ist von F. EMICH durch eine federnde Zange verbessert worden[13]. Noch bequemer im Gebrauch und vielfach anwendbar ist der folgende Kapillarhalter, der in Fig. 1 (Nr. 4, Seite 224) zu sehen und in Fig. 2 (I und I') schematisch dargestellt ist.

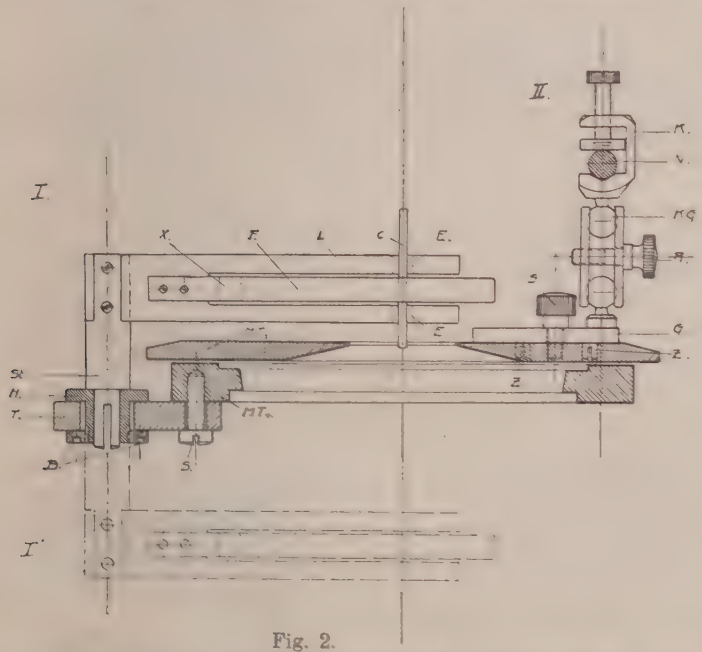


Fig. 2.

Kapillarhalter (I und I') und mikrochemischer Manipulator (II). (Schematisch in $^2/_3$ der natürlichen Größe. Buchstabenerklärung im Text.)

[12] Diesen ebenen Rand der Kapillare erhält man nur dann, wenn man im Besitze eines wirklich gut ritzenden Glasmessers ist. Im Metallographischen Institut in Stockholm, Vorstand Prof. Dr. C. BENEDICKS, werden Messer mit bestimmten Winkeln von 80 und 100° verwendet (für normales Biegeglas und Hartglas), die sich sehr gut bewähren. Zum Schärfen der Messer unter Erhaltung dieser Winkel lernte ich dort einen ganz einfachen und sehr praktischen Apparat kennen.

[13] l. c.; II. S. 86.

Der Trägerteil besteht aus einer 2 bis 3 mm dicken U-förmigen Leiste L mit 2 V-förmigen Einkerbungen E, gegen die der zu haltende Gegenstand (z. B. die Kapillare C) durch eine federnde Leiste F gedrückt wird. Dadurch, daß dieser Teil bei x um einige Millimeter erhöht ist, klemmt er einerseits sehr feine Glaskapillaren und Glasfäden bis zirka 0,1 mm Außendurchmesser ohne schädigende Durchbiegung, anderseits runde Gegenstände bis 10 mm lotrecht ein. Diese Klemmvorrichtung ist mit einem unten aufgeschnittenen Stift St verbunden, der zügig in die Hülse H paßt; in diese wird der Kapillarhalter entweder von oben (Stellung I) oder von unten (Stellung I') eingesetzt und bringt dann den Gegenstand (entsprechend über oder unterhalb[14] des Objekttisches M. T) in die Mikroskopachse. Damit der Kapillarhalter innerhalb einiger Millimeter in bezug auf die optische Achse verstellt werden kann, ist die Hülse H in dem am festen Unterteil $M.T_1$ des drehbaren Mikroskoptisches $M.T_2$ befestigten kurzen Trägerarm T verschiebbar eingesetzt; ein eigener Schlüssel löst die Fixierung durch Einsetzen in die Bohrungen B, worauf die eventuell notwendige Nachjustierung vorgenommen wird. Kapillarhalter und Schlüssel sind in Fig. 1 (Nr. 4 und 5, Seite 224) zu sehen.

Die Möglichkeiten der Anwendung des Kapillarhalters sollen an Hand einiger Beispiele erörtert werden.

1. Beobachtung schwacher Färbungen bei axialer Durchleuchtung in der Kapillare. Das sofortige Einschwenken in die optische Achse, die lotrechte Lage der Kapillare und das sichere Festklemmen verschieden dimensionierter Kapillaren ohne Durchbiegung sind als Vorteile des Kapillarhalters zu nennen. Um eine ebene Oberfläche der zu prüfenden Flüssigkeit zu erlangen, legt man auf den Rand der Kapillare ein Deckgläschen auf, das von einem Glasstäbchen oder einer Pinzette gehalten wird, die im mikrochemischen Manipulator (Figur 2, II, Seite 225) befestigt sind. Die Länge der Kapillaren ist nach unten mit zirka 15 mm, nach oben durch den Objektabstand (Kapillaroberfläche: Objektiv) begrenzt.

Einige Ergebnisse: a) Blaufärbung von Cu^{++}-Lösungen mit Ammoniak[15], lichte Weite der Kapillaren 0,3 bis 0,6 mm. Vergrößerung 50- bis 200mal. Erfassungsgrenze: 1 γ (gut bewährt sich das Einschalten eines Gelbfilters in die Beleuchtungsvorrichtung, wodurch eine grüne Färbung zur Beobachtung gelangt); b) Rotfärbung von Fe^{+++}-Lösungen mit Kaliumrhodanid unter gleichen Bedingungen. Erfassungsgrenze: 0,1 γ (Blaufilter); c) Violettfärbung von Fe^{++}-Lösungen mit α, α'-Dipyridyl[16]. Erfassungsgrenze: 0,03 γ.

[14] In diesem Falle muß der Kondensor vorher herausgeschwenkt oder herausgenommen werden (vgl. Figur 4, Seite 240).

[15] F. Emich, l. c.; II, S. 86.

[16] F. Feigl und H. Hamburg, Ztschr. analyt. Chem., 86, 7 (1931).

Der Halter dürfte in gleicher Weise bei der mikrospektroskopischen Analyse[17], bei Fluoreszenz- und mikrokolorimetrischen Untersuchungen gute Dienste leisten.

2. Das Ausmessen des Durchmessers von Kapillaren und Glasröhrchen unter dem Mikroskop ist wichtig für die Dosierung und Kalibrierung. Zahlreiche solcher Messungen waren zum Beispiel anläßlich der von F. Emich und Mitarbeitern[18] ausgeführten Schlierenversuche an Kapillarpipettchen notwendig; hierzu wird der Kapillarhalter unterhalb des Objekttisches eingeschwenkt (vgl. Fig. 2, I', S. 225). Des öfteren sind Fehlresultate bei den C- und H-Bestimmungen nach F. Pregl in der unrichtigen Dimensionierung der Kapillaröffnungen der Absorptionsapparate[19] begründet, weshalb deren Kontrolle durch Ausmessen unter dem Mikroskop manchen Ärger erspart.

3. Bei qualitativen Mikroelektrolysen wird die Nadelelektrode[20] (Fig. 4, S. 240) in den Kapillarhalter eingespannt, um die Abscheidung auf den Elektrodenflächen im auffallenden Lichte zu beobachten. Bei Gegenständen, die so lang sind, daß die Tischfläche stören würde (z. B. Anschliffe an Stäben, Querschnitte von Röhren usw.), wird das Mikroskop in die waagrechte Lage gekippt (Auflichtbeleuchtung!).

4. Überdies ist der Kapillarhalter als federnde Haltevorrichtung bei solchen mikrochemischen Reaktionen, die nicht gerade unter dem Mikroskop ausgeführt werden, von Nutzen und wird in diesem Falle dann aus dem Mikroskop herausgeschwenkt.

[17] F. Emich, l. c.; I. S. 62. Ein spezielles Beispiel: die Blutanalyse nach M. Wagenaar, Ztschr. analyt. Chem., **79**, 108 (1929).

[18] F. Emich, I. Mitt., Monatsh. f. Chem., **50**, 269 (1928); II. Mitt., ebenda. **53/54**, 312 (1929); H. Alber und M. v. Renzenberg, III. Mitt., Ztschr. analyt. Chem., **86**, 114 (1931); E. Schally, IV. Mitt., Monatsh. f. Chem., **58**, 399 (1931); H. Alber, V. Mitt., Ztschr. analyt. Chem., **90**, 87 (1932). Vgl. F. Emich, l. c.; II. S. 38.

[19] Vgl. M. Boëtius, Über die Fehlerquellen bei der mikroanalytischen Bestimmung des C und H nach der Methode von F. Pregl. Berlin 1931, S. 74.

[20] H. J. Brenneis, Mikrochemie, **IX**, 385 (1931); H. Alber, Jernkontorets Annaler, **116**, 519 (1932), Figur 1; vgl. hierzu Seite 237, Fußnote 19.

III. Manipulator für mikrochemische Arbeiten (mikrochemischer Manipulator).

Der erste Schritt in der Untersuchung eines Stoffes oder eines Gemenges ist die Isolierung und Trennung der unter dem Mikroskop durch Farbe, Gestalt und andere Eigenschaften deutlich unterscheidbaren Bestandteile. Das Lostrennen eines Teilchens vom Untergrund, das Auslesen von Pulvergemischen, das Zerteilen einer Probe und ähnliches mehr sind Aufgaben, vor die der Mikrochemiker immer wieder gestellt wird. Durch eine solche rein mechanische Analyse, die ohne tiefergreifende Beeinflussung und Veränderung der Probe durch ein Lösungsmittel der eigentlichen chemischen Analyse vorausgeht, ist man imstande, schon weitgehende Schlüsse auf die Art der Probe und auf den bei der Analyse einzuschlagenden Weg zu ziehen.

Für einige Zwecke der physikalisch-chemischen Forschung sowie für die Zell- und Mikrobiologie, wo man es mit Gebilden von der Größenordnung einer Zelle zu tun hat und dementsprechend Vergrößerungen bis 1000mal notwendig werden, dienen die bekannten Mikromanipulatoren[1], deren Handhabung aber immerhin große Geduld und Geschicklichkeit erfordert und bei denen die individuelle Tätigkeit des Experimentators durch mechanische Einrichtungen möglichst zurückgedrängt wird.

Der Mikrochemiker hat es normalerweise etwas leichter, da seine Manipulationen doch nicht mit so kleinen Gebilden und bei schwächeren Vergrößerungen (bis 200mal) erfolgen. Die meisten Operationen wird er von freier Hand aus bewältigen können, wenn er über ein gewisses Training und genügend Erfahrung verfügt. Was aber dem experimentellen Geschick des erfahrenen Mikrochemikers gut gelingt, kann dem Anfänger Schwierigkeiten bereiten. Aus den eingangs angeführten Gründen war demnach die Schaffung eines apparativen Hilfsmittels erwünscht, welches eine

[1] Literatur bei E. M. Chamot und C. W. Mason, l. c.: I. S. 144. Vgl. auch Seite 221 dieser Abhandlung, Fußnote 4.

Neuere Instrumente z. B.: A. N. Richards, J. biol. Chemistry, **87**, 463 (1930); P. de Fonbrune, C. R. hebd. Séances Acad. Sci, **195**, 603, 706 (1933); durch C., **104**, I. 1323 (1933). L. O. Koblmüller und R. W. Viertha ler (Ztrbl. Bakteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankh., Abt. I. **129**, 438 [1933]) beschreiben einen neuen Oberflächenmanipulator („Platinmanipulator").

sichere Führung der Hand bei möglichst allen Manipulationen unter dem Mikroskop übernimmt.

Von C. Weygand und W. Grüntzig[22] ist ein „chemischer Mikromanipulator für alle analytischen Mikroskopreaktionen" beschrieben worden; er besteht aus einem Heiztisch und einem massiven Oberteil, der am Bügel des Mikroskopstativs befestigt ist. Durch unter 45° geneigte Tuben werden die verschiedenen Arbeitsgeräte (z. B. Impfstift, Thermoelement), die in einfachen Haltern befestigt sind, eingeführt. Der Apparat findet bei Untersuchungen über den Polymorphismus organischer Substanzen Anwendung.

Für alle Reaktionen bei normaler Temperatur eignet sich aber besser eine Anordnung, die auf dem Objekttisch selbst oder seitlich desselben rasch befestigt und wieder entfernt werden kann und nicht so kompendiös ist, daß die üblichen mikroskopischen Untersuchungen irgendwie gestört werden. Die Bewegungsmöglichkeit soll nach allen Seiten hin (ohne Behinderung durch einen Tubus usw.) erhalten bleiben. Diese Forderungen erfüllt der Manipulator für mikrochemische Arbeiten oder — kurz — der mikrochemische Manipulator, wie ich ihn im Gegensatz zu den für die allerfeinsten Zwecke bestimmten Mikromanipulatoren nennen möchte.

Eine kleine Grundleiste G (Figur 2, Seite 225), die mittels zweier kleiner Zapfen Z und einer Schraube S in Bohrungen des Mikroskoptisches $M.T_2$ genügend fest angebracht wird, trägt den eigentlichen Manipulator, der nur aus einem doppelten Kugelgelenk KG und einer Klemmvorrichtung K für die Arbeitsgeräte N besteht. Die Klemmvorrichtung K hält runde Gegenstände mit Durchmessern von 3 bis 9 mm fest; kleinere Gegenstände (feine Kapillaren, Nadeln usw.) werden in eigene Nadelhalter N eingeführt[23], die Durchmesser von 1) 0,3 bis 0,5 mm, 2) 0,5 bis 2 mm und 3) 2 bis 3 mm sicher fassen. Überdies ist noch ein Halter für längere Gegenstände von 0,2 bis 2 mm Durchmesser (z. B. Kapillaren, Mikropipettchen usw.) vorgesehen, der an seinem freien Ende in Form eines langgestreckten Rechteckes durchbohrt ist; eine bewegliche Backe, die unter schwachem Federdruck steht, klemmt beispielsweise drei Kapillaren von je 2 mm ein oder acht Kapillaren von verschiedenen Durchmessern (0,5, 0,8, 1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,8 und 2 mm) und ähnliches mehr.

Ein gleicher Manipulator, der an Stelle der Grundleiste G einen aufgeschnittenen, federnden Stift wie der Kapillarhalter (unterer Teil von St in Figur 2, I, Seite 225) besitzt, wird in die Hülse H des Trägerarmes T eingesetzt.

[22] Mikrochemie, X, 1 (1931/32).

[23] R. N. Titus und H. Le B. Gray, Ind. Engin. Chem., Analyt. Edit., 2, 368 (1930), Figur 2 b.

Im Objekttisch können ebenfalls noch weitere Bohrungen für die Befestigung eines dritten Manipulators angebracht werden, jedoch genügen in den meisten Fällen zwei Manipulatoren bei gleichzeitiger Verwendung.

Das Manipulieren mit den Arbeitsgeräten, das sonst von freier Hand aus erfolgte, erhält durch den Manipulator eine sichere Führung, während der individuelle Charakter der Handbewegung bewahrt bleibt; dies ist wichtig für kratzende, schürfende, abhebende und schneidende Manipulationen. Für manche Zwecke ist eine mehr lockere und lose Führung, für andere wieder eine möglichst strenge und gewissermaßen widerstrebende Führung durch den Manipulator erwünscht; eine Änderung der Einstellung wird durch Anziehen oder Öffnen der Anziehschraube A (Fig. 2, II, Seite 225) erreicht, welche die Fixierung des doppelten Kugelgelenkes KG bewirkt.

Sollen feine Verschiebungen in der horizontalen Ebene stattfinden, wobei die rein mechanische Bewegung mehr hervortritt, wird der Manipulator mit einem Objektführer[24] verbunden, bei dem an Stelle des Teiles, der sonst die Präparate klemmt, ein halbkreisförmiger Bogen mit einem etwas erweiterten Scheitelstück zum Aufschrauben des Manipulators angebracht ist. Das Präparat wird in der freien Ausnehmung dieses Objektführers durch eine spezielle U-förmige Klemme festgehalten. (Fig. 1, Nr. 6, 7 und 10, Seite 224).

Wenn man Manipulationen bei höheren Temperaturen vornehmen will[25], bringt man den Manipulator an einem Ring an, der z. B. auf den Mikroschmelzpunktapparat nach L. Kofler und H. Hilbck[26] aufgesetzt wird. Die schützende Glasplatte kann, wenn nötig, mit entsprechenden Öffnungen versehen sein.

Die Arbeitsgeräte für den mikrochemischen Manipulator sind ähnlich denen, die für die „mikrurgischen" Verfahren schon mehrfach beschrieben worden sind[27]; meistens wird man sich dünne Glasfäden und Glaskapillaren über einer möglichst feinen Flamme selbst ausziehen oder mit in Glasstäbchen eingeschmolzenen Platindrähten, Präpariernadeln[28], zugeschliffenen Nähnadeln, Stahlstift usw. das Auslangen finden. Als Mikropipetten eignen sich Glaspipettchen

[24] Vgl. die Druckschriften der optischen Firmen über aufsetzbare Objektführer.

[25] Hier eignet sich wohl besser die für solche spezielle Zwecke geschaffene Anordnung von C. Weygand und W. Grüntzig, l. c.

[26] Mikrochemie, **IX**, 38 (1931).

[27] Siehe z. B. É. M. Chomot und C. W. Mason, l. c.; I., 141 ff.; R. N. Titus und H. Le B. Gray, l. c.

[28] L. O. Koblmüller und R. W. Vierthaler, l. c., verwenden zur Isolierung einzelner Bakterien Metallnadeln, die nach einem besonderen Verfahren gehärtet und trotz ihrer Feinheit (Spitze bis 0,0005 mm Durchmesser) widerstandsfähig und ausglühbar sind.

mit Gummiverschluß oder einseitig zugeschmolzene Kapillaren, in denen die Flüssigkeitsbewegung durch Erwärmen oder Abkühlen am zugeschmolzenen Ende reguliert wird. Sehr gute Dienste leistete eine etwas modifizierte Pipette nach dem Bürettenprinzip von F. EMICH und S. WERMUTH[29], bei der die Flüssigkeit durch einen in Quecksilber beweglichen Stempel herausgedrückt wird.

Da Vergrößerungen bis 200mal für die meisten Zwecke ausreichend sind[30], genügen das Objektiv 1 (von Reichert) mit einem Objektabstand von 20 mm und das Objektiv 3 (Objektabstand = zirka 7 mm) in Verbindung mit entsprechenden Okularen, ohne daß man eine Gefährdung der Objektive beim Arbeiten mit dem mikrochemischen Manipulator besonders zu befürchten hätte; immerhin ist aber die Anwendung der geschützten Objektive (Seite 223) angezeigt. Angenehm und zweckmäßig ist es, wenn man die Hand während der Ausführung der verschiedenen Operationen auf eine feste Unterlage aufstützt; einfache Handauflagen, die nicht in Verbindung mit dem Mikroskop stehen, haben sich hierfür als sehr geeignet erwiesen. Auf den Einfluß des Untergrundes bei Mikromanipulationen im auffallenden Lichte sowie auf die Farbe der Beleuchtung wurde schon früher hingewiesen.

Das aufrechte plastische Bild, das durch ein binokulares Instrument entsteht, schafft bei allen Manipulationen unter dem Mikroskop wesentliche Erleichterungen. Wenn besonderer Wert auf die Plastizität des Bildes gelegt wird, verwende man einen der üblichen binokularen Aufsätze; für die vorliegenden Zwecke hat sich in Verbindung mit dem Polarisationsmikroskop ein Schrägblickaufsatz mit Bildaufrichtung als völlig ausreichend und sehr zweckmäßig erwiesen.

Die meisten der hier angeführten Apparate sind in Fig. 1 (S. 224) abgebildet.

Bei zahlreichen Untersuchungen und Demonstrationen ist dieser Manipulator erfolgreich in Aktion getreten und hat sich auch beim Anfängerunterricht recht gut bewährt; es seien hier nur einige, eigentlich wahllos herausgegriffene Beispiele angeführt:

1. Als Übungsbeispiel für das präparative Arbeiten wird von F. EMICH[31] das Auslesen von Pulvergemischen angegeben. Mit dem mikrochemischen Manipulator kommt man

[29] STÄHLER-TIEDE-RICHTER, Handbuch d. Arbeitsmethoden in der anorganischen Chemie, II, 672, Berlin und Leipzig, 1925.

[30] R. N. TITUS und H. LE B. GRAY, l. c., weisen darauf hin, daß Flecken in Papier, die bei 200facher Vergrößerung kleiner sind, als daß man mit ihnen manipulieren könnte, auf chemischem Wege keine sichtbaren Reaktionen mehr geben.

[31] l. c.; I. S. 17, II. S. 73.

schneller und sicherer zum Ziel als mit freier Hand; ganz besonders dann, wenn man dieses Verfahren einem größeren Zuhörerkreis demonstrieren will. Die Versuche werden im auffallenden Licht mit verschiedenen Lichtsorten (Filter!) und entsprechendem Untergrund ausgeführt. Für Übungszwecke eignen sich Mischungen im Verhältnis von 1 : 10 bis 1 : 100 von Bariumsulfat, Bariumchlorid, Kaliumchlorid, Ammonsulfat, Kalziumkarbonat als weiße Grundkörper und Bleiverbindungen, Kaliumbichromat, Farbstoffe, wie Methylenblau, Malachitgrün, Kongorot, als farbige Komponente.

2 Reaktionen mit Gespinstfasern[52]. Ein Glasstäbchen von 5 mm Durchmesser wird an einem Ende auf etwa 1 mm fein ausgezogen; mit Kanadabalsam wird daran eine Gespinstfaser angeklebt und alle weiteren Operationen — Reinigen des Fadens, Tränken mit verschiedenen Lösungen, die Anstellung des Versuches selbst, das nachherige Waschen und die Beobachtung der Farbveränderung, anschließende weitere Umsetzungen — können unter ständiger Kontrolle unter dem Mikroskop dadurch sehr erleichtert werden, daß das Stäbchen in den mikrochemischen Manipulator eingespannt wird. Besonders vorteilhaft ist es, daß man die Verfärbung des Fadenendes während des Verdunstungsvorganges selbst beobachten und leicht kontrollieren kann, ob das Fadenende wohl wirklich die Oberfläche des Tröpfchens berührt, da sich die Flüssigkeit ja an einem möglichst kurzen Stückchen der Faser konzentrieren soll. Objektivschutz darf nicht außer acht gelassen werden! Unter Umständen ist die Ausführung der Reaktion auf einem Heiztisch[53] angezeigt, wobei der Verdunstungsvorgang durch das Erwärmen beschleunigt wird.

Zur Kontrolle wurden zahlreiche Fadenreaktionen, unter anderem an Goldlösungen, durchgeführt, und besonders sei auf die Fadenreaktionen von P. Ray[54] zum Nachweis von Nickel, Kobalt und Kupfer mittels Rubeanwasserstoffsäure aufmerksam gemacht, da sich damit ganz besonders niedrige Erfassungsgrenzen erreichen lassen (in der Reihenfolge 0,0002, 0,006 und 0,002 γ).

[52] F. Emich, l. c.; I. S. 58. II. S. 76, 80.

[53] Z. B. der Mikroschmelzpunktapparat nach L. Kofler und H. Hilbck, l. c.

[54] Ztschr. analyt. Chem., 79, 94 (1929).

3. Herstellung von Dauerpräparaten[35]. Die verschiedenen Operationen bei der Darstellung von Dauerpräparaten — Zugabe der Reagenzien, Vereinigen der Probetropfen, Absaugen der Mutterlauge, Zusatz von Waschflüssigkeit, neuerliches Absaugen ohne die Kristallanordnung zu zerstören, Herausfischen von Staub- und Faserteilchen, Herausarbeiten von unschönen Stellen usw. — werden durch die Anwendung des mikrochemischen Manipulators sehr erleichtert, und das gleiche ist von der Ausführung der Kristallfällungen zu sagen; ganz besonders dann, wenn solche demonstriert oder projiziert werden sollen, wie beispielsweise das Verfahren von É. M. Chamot und H. A. Bedient[36] („Strichmethode" für den Nachweis von Natrium mit Zink-Uranylacetat). Bei der Überprüfung des Verfahrens von J. Winckelmann[37] (Tüpfelreaktionen und Kristallfällungen in Gelatine unter besonderer Berücksichtigung der Herstellung von Dauerpräparaten) konnten z. B. 0,001 γ und weniger Chrom (schon als Chromat vorliegend) nachgewiesen werden[38], indem man Glyzerin-Gelatine mit alkoholischer Diphenylcarbazidlösung mischt und auf dem Objektträger erstarren läßt. Mit feinen Mikropipetten setzt man allerkleinste Tröpfchen der Chromatlösung und 2 n-Schwefelsäure nebeneinander (ohne daß sie sich berühren) auf diese Schichte auf und beobachtet im auffallenden Lichte (weißer Untergrund) die violett-rote Färbung, die bei der Diffusion in der Berührungszone entsteht. Tüpfelreaktionen von Kupfer, Nickel und Kobalt mit Rubeanwasserstoffsäure in Gelatine eignen sich ebenfalls sehr gut (Erfassungsgrenzen ungefähr wie bei F. Feigl[39]), während 0,001 γ Nickel und weniger in mit Dimethylglyoxim versetzter Gelatine (Beobachtung im auffallenden Lichte bei eingeschaltetem Analysator) einzelne Kristallnädelchen ergeben, die deutlichen Pleochroismus zeigen[40].

---

[35] F. Emich, l. c.; I. S. 68, II. S. 42.

[36] Mikrochemie, **VI**, 18 (1928).

[37] Mikrochemie, **X**, 437 (1931/32); **XII**, 119 (1932/33). Vgl. auch A. Martini, ebenda, **VII**, 236 (1929).

[38] F. Feigl, l. c.; S. 206.

[39] l. c.; S. 154, 199, 193.

[40] Vgl. F. Kirschner, Mikrochemie, **I**, 88 (1923); Reaktion im Dunkelfeld mit einer Erfassungsgrenze von 0,0003 γ Nickel.

4. Herausarbeiten von Schlackeneinschlüssen in Metallschliffen, von örtlich begrenzten Inhomogenitäten in Schliffen und in Oberflächen mittels harter Stahlnadeln.

5. Sehr angenehm ist die Verwendung einer feinen Nadel oder eines feinen Drahtendes (abgeätzter Wollastondraht) als Zeiger bei Demonstrationen, dessen Ende man mittels des Manipulators knapp oberhalb die Stelle bringt, auf die man hinweisen will[41].

Aus diesem Überblick, der sich nur auf einige von den in der letzten Zeit ausgeführten Versuchen beschränkt, geht hervor, welch allgemeine Verwendung der Kapillarhalter sowie der mikrochemische Manipulator finden können; überdies sollen noch Versuche beschrieben werden, deren leichtere Durchführung eng mit der Ausgestaltung dieser beiden Arbeitsgeräte verknüpft ist.

IV. Einige Bemerkungen zur qualitativen Mikroelektrolyse.

a) Empfindlichkeit und Identifizierung.

Der von H. J. Brenneis[42] im Emich'schen Institut unternommene Versuch, mittels kleiner Elektroden minimale Mengen von Metallen (Größenordnung $= 0.001 - 0.0005\,\gamma$) elektrolytisch abzuscheiden, hat besonders für das Gebiet der „Spurensuche" auch deshalb große Bedeutung, weil die Abscheidung genügend quantitativ ist. Durch Berechnungen wurde festgestellt, daß man die Elektrolyse von Kupfer bis zu einer Konzentration von 10^{-20} treiben kann, das ist also eine Grenze, bei der mit den heutigen Mitteln ein qualitativer Nachweis illusorisch wird. In dieser Arbeit wird betont, daß man bedeutend bessere Leistungen dann erzielen können wird, wenn man zu höheren Vergrößerungen (bei gleichzeitiger Verkleinerung der Elektrodenfläche) und besseren apparativen Hilfsmitteln übergeht.

Im allgemeinen ist zu bemerken, daß man schon durch die Variation der Bedingungen bei der Elektrolyse

[41] Hierfür sind allerdings schon spezielle Anordnungen, wie Zeigerokulare usw., vielfach in Anwendung.

[42] Mikrochemie. **IX**, 385 (1931); diese Versuche wurden dann von Herrn Ing. E. P. Salzer mit Hg, Cd, Zn, Bi fortgesetzt, worüber aber bis auf einige Angaben auf S. 392 der zitierten Arbeit keine weitere Veröffentlichung erschienen ist. Diplomarbeit 1931 an der Technischen Hochschule in Graz, Lehrkanzel für allgemeine Chemie.

in der Lage ist, Rückschlüsse auf das abgeschiedene Ion zu ziehen (Abscheidung an der Anode oder Kathode, Spannung, pH). Leider ist das Aussehen, der Glanz und die Farbe der Abscheidungen meistens nur dann charakteristisch[42a], wenn sie allein in der Lösung anwesend waren und wenn ganz bestimmte Versuchsbedingungen eingehalten wurden (Kupfer, Gold). Bei der Spurensuche, wo es auf die Identifizierung von Spuren in möglichst großen Mengen verschiedener anderer Elemente ankommt, ist das Einhalten solcher Bedingungen wohl kaum möglich, und es ist in diesem Zusammenhange beispielsweise auf die Veröffentlichungen von M. SCHLOETTER[43] hinzuweisen, der den Nachweis führt, daß durch mitgerissene Anionen die Eigenschaften der elektrolytisch niedergeschlagenen Metalle in bezug auf Farbe, Glanz und Verhalten gegenüber Reagenzien völlig geändert werden können („passives Verhalten").

Um das in sehr geringer Menge abgeschiedene Metall eindeutig zu identifizieren, müssen wir daher weitere möglichst spezifisch geführte Reaktionen zu Hilfe nehmen. Es soll aber gleich betont werden, daß die Empfindlichkeit dieses elektrolytischen Verfahrens so groß ist, daß es Schwierigkeiten bereitet, für jedes Ion mikrochemische Kontrollreaktionen zu finden, die angenähert dieselben Erfassungsgrenzen besitzen.

Einige Wege zur weiteren Identifizierung sind:

1. Beobachtung des Löslichkeitsverhaltens bei Zusatz verschiedener Lösungsmittel (Kupfer — Gold gegenüber konz. Salpetersäure).

2. Einwirkung von Reagenzien auf die Abscheidungen (Räuchern mit Jod bei Quecksilber, Benetzen mit Schwefelammon bei Silber).

3. Lösen der Niederschläge und Ausführung von Reaktionen auf der Elektrodenoberfläche selbst (Fadenreaktionen bei Kadmium).

4. Die gelöste Abscheidung wird durch Mikropipetten von der

[42a] Die Beobachtung unter dem Mikroskop erfolgt bei schief auffallendem Lichte einer Beleuchtungslampe oder mittels eines Vertikalilluminators. Bei der Wahl des letzteren hat man aber Vorsicht walten zu lassen, da sich bei einigen, noch nicht abgeschlossenen Vorversuchen ergeben hat, daß nicht alle Konstruktionen für diesen speziellen Zweck geeignet sind.

[43] Chem.-Ztg., **57**, 533 (1933).

Elektrode entfernt, und mit dieser nunmehr möglichst konzentrierten Lösung werden z. B. Kristallfällungen und Fadenreaktionen (Blei), Farb- und Fällungsreaktionen in der Kapillare[44] (Kupfer, Zink), Tüpfelreaktionen (Kupfer), Luminiszenzreaktionen[45] (Wismut) oder spektroskopische Versuche angestellt.

5. Man benützt den Niederschlag direkt zu einer Art Abdruckverfahren, wie es M. NIESSNER[46] für Metallschliffe angibt.

Diese Zusammenstellung zeigt neuerdings, daß die Vorteile der Brenneiselektroden bei der „Spurensuche" vor allem in der Anreicherung des gefragten Ions auf einer möglichst kleinen Fläche liegen, daß also mit anderen Worten die Platinscheibchen die Rolle eines „Spurenfängers" in einem Zwischenstadium bis zur endgültigen Identifizierung übernommen haben.

Es muß wohl nicht besonders betont werden, daß bei Manipulationen mit Substanzmengen von $0{,}00x\,\gamma$ im Mikrotröpfchen entsprechende Sorgfalt gefordert werden muß und daß jedes apparative Hilfsmittel, welches die Handhabung erleichtert und die Reaktion exakter gestalten läßt, Beachtung verdient. Aus diesem Grunde sind die folgenden Versuche etwas ausführlicher behandelt: sie beschäftigen sich aber vorwiegend mit der manipulativen Seite und nicht mit der Bestimmung von Empfindlichkeiten und Spezifität des Verfahrens[47].

b) Methodik und Apparate.

Bisher wurde vorwiegend mit dem elektrolytischen

[44] P. RAY, l. c. Dieses Verfahren, das in ähnlicher Weise von E. P. SALZER erfolgreich beim Zinknachweis mit Dithizon verwertet wurde, beruht auf einer Anreicherung von Fällungen an der Grenzfläche zweier nur wenig mischbarer Flüssigkeiten.

[45] J. DONAU, Monatsh. f. Chem., 34, 949 (1913). Vgl. F. EMICH, l. c.; I. S. 153, II. S. 87.

[46] Mikrochemie, XII, 1 (1932/33).

[47] Da mir nicht genügend „reine" Reagenzien, an die bei so niedrigen Erfassungsgrenzen die höchsten Anforderungen zu stellen sind (Kupfer- und Quecksilberspuren!), zur Verfügung standen, konnte ich auf diese interessanten und wichtigen Einzelheiten derzeit nicht näher eingehen.

Objektträger (Fig. 1, S. 224) und daher mit kleinen Flüssigkeitströpfchen (1 bis 0,1 cmm) gearbeitet, was bei Kupfer immerhin schon einer Grenzkonzentration von 1 : 2,000.000 entspricht.[48] Handelt es sich aber darum, aus größeren Flüssigkeitsmengen (zum Beispiel 10 ccm) kleine Mengen eines Metalles durch Elektrolyse herauszufangen, dann steht wohl die Anwendung der Stab-, bezw. Nadelelektrode im Vordergrund des Interesses. Der Nadelelektrode von H. J. Brenneis habe ich[49] eine handlichere Form gegeben, welche die Gefahr eines Bruches der 0,7 bis 1 mm dünnen Glaskapillare, in welche die beiden Platindrähte eingeschmolzen sind, auf ein Mindestmaß reduziert und das Manipulieren sowie das Aufbewahren erleichtert. (Vergl. Fig. 1, 3, 4).

Mit einer solchen Elektrode (Durchmesser der Platinscheibchen = 0,05 mm) konnten z. B. aus 5 ccm Elektrolyt 0,005 γ Kupfer[50] niedergeschlagen, als rötlichbrauner Niederschlag beobachtet und mit Kontrollreaktionen als Kupfer identifiziert werden; dies entspricht einer Grenzkonzentration von rund 1 : 1.000,000.000 (Leerversuche parallel waren negativ).

Es ist vielleicht am einfachsten, an Hand eines Beispieles und einiger Abbildungen eine Anschauung davon zu vermitteln, wann und wie Kapillarhalter und mikrochemischer Manipulator bei der qualitativen Mikroelektrolyse gehandhabt werden.

Trennung von Blei-Kupfer: Nadelelektrode (neue Form) mit Platindrähten von 0,05 mm. Zusammensetzung des Elektrolyten: 5 ccm Lösung mit 0,05 γ Pb (aus Bleiacetat p. a.) und 0,05 γ Cu (aus Kupferacetat p. a.) sowie 0,8 ccm HNO_3

[48] H. J. Brenneis, l. c.

[49] H. Alber, Jernkontorets Annaler, **116**, 519 (1932). Fig. 1. Die Elektrode ist in Hartgummi gefaßt; die mit + und — bezeichneten Metallzapfen für den Stromanschluß stehen mittels zweier im Innern geführter Messingstäbchen mit den Platindrähten in Verbindung. Als Schutz für die feine Kapillare wird eine mit einem Hartgummigewinde versehene gläserne Schutzkappe, die auch als feuchte Kammer dienen kann, auf den mit einem entsprechenden Gewinde versehenen Hartgummiträger aufgeschraubt. Die Elektrode kann wie eine Füllfeder in der Rocktasche transportiert werden.

[50] Diese Menge ist in dem Elektrolyten vorhanden; daß unter den obwaltenden Versuchsbedingungen eine vollständige Abscheidung eintritt, ist anzunehmen, aber keineswegs quantitativ überprüft worden.

(d = 1,4), entsprechend einer Verdünnung von 1 :100,000.000 für Cu und Pb[51].

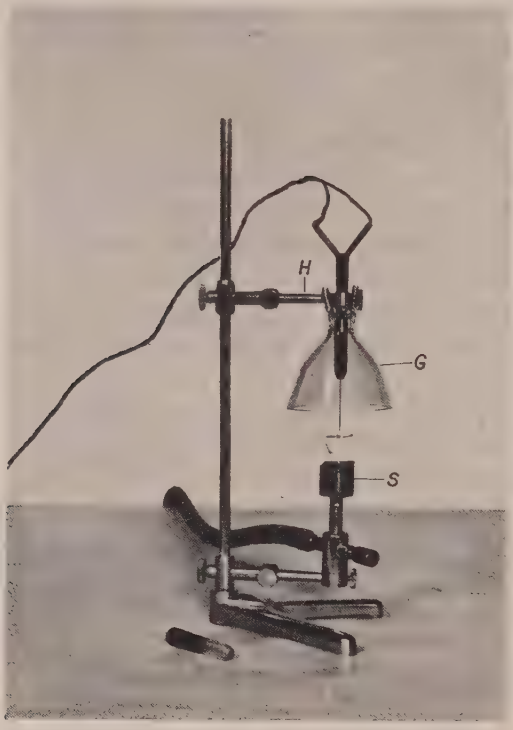


Fig. 3.

Mikrouniversalstativ, angewendet bei der qualitativen Mikroelektrolyse mittels der Nadelelektrode. (Buchstabenerklärung im Text[52].)

Die Nadelelektrode wird in der aus Figur 3 ersichtlichen Weise in eine Haltevorrichtung H eingespannt, die es gestattet, die Elektrode nach drei Richtungen hin zu verschieben und mittels Drahtspiralen eine Glasglocke G anzubringen.

[51] Es können in der gleichen Weise, wie hier beschrieben, auch noch kleinere Mengen der beiden Metalle nebeneinander bestimmt werden; dieses Beispiel ist nur als eine Art Musterbeispiel gedacht.

[52] Aus Gründen der Deutlichkeit ist die Glasglocke in der Abbildung etwas in die Höhe geschoben. In Wirklichkeit wird sie tiefer über das Porzellantiegelchen heruntergesenkt, damit möglichst wenig Staub dazukommen kann.

die eine Verunreinigung durch Staub während der Elektrolyse verhindern soll[53]. Die Elektrode wird in den Elektrolyten eingesenkt, der sich in einem kleinen Porzellantiegelchen befindet[54]. Die Elektrolyse wird bei 3 Volt Spannung begonnen, wobei sich anfänglich vorwiegend das Blei abscheidet. Nach Verlauf von 1 bis 2 Stunden, während welcher die Flüssigkeit von Zeit zu Zeit mit der Elektrode durchgemischt wird, zieht man die Nadelelektrode (ohne den Strom zu unterbrechen) heraus und spült vorsichtig mit wenig Wasser ab. Die Nadelelektrode wird in den Kapillarhalter (Fig. 4), der sich unterhalb des Objekttisches befindet, eingespannt und in die optische Achse eingeschwenkt. Bei Auflichtbeleuchtung (z. B. mit Vertikalilluminatoren) wird die Farbe des Niederschlages (dunkelbraun) und die anodische Abscheidung festgestellt. Mittels eines feinen Glasfadens, der in einem Nadelhalter des mikrochemischen Manipulators befestigt ist, setzt man ein winziges Tröpfchen[55] $HNO_3 + H_2O_2$ auf der der Kathode K abgewendeten Seite (bei x in Fig. 5) auf. Nun zieht man das Tröpfchen mit dem Glasfaden über die Anode A (bis zur punktierten Linie), ohne daß die Kathodenoberfläche K und damit das eventuell schon abgeschiedene Kupfer berührt wird (Verwendung des Manipulators erforderlich!). Man beobachtet die Auflösung des PbO_2 und entfernt dann mittels einer Mikropipette (unter ständiger Kontrolle unter dem Mikroskop) die solcherart konzentrierte Bleilösung von der Elektrodenoberfläche, wäscht mit einem Tröpfchen Wasser nach und identifiziert das Blei entweder durch eine Kristallfällung ($K_2CuPb(NO_2)_6$, Erfassungsgrenze = 0,003 γ Pb) oder durch eine Fadenreaktion (als PbS, Erfassungsgrenze = 0,008 γ Pb).

[53] Neu an dieser Anordnung ist die Glasglocke G und der Elektrodenhalter H, wodurch die von mir früher beschriebene (H. ALBER, l. c.) improvisierte Zusammenstellung verbessert wird. Die Stative selbst stehen als Mikrouniversalstative am Institut für allgemeine Chemie der Technischen Hochschule in Graz seit zirka vier Jahren in Gebrauch; an Stelle des Elektrodenhalters H kann z. B. der Apparat für die quantitative Mikroelektrolyse von F. PREGL (Die quant. org. Mikroanalyse, III. Aufl., 187 [1930]) oder der von mir etwas modifizierte Trockenblock für den Filterbecher nach E. SCHWARZ VON BERGKAMPF (Ztschr. analyt. Chem., **69**, 336 [1926]) eingesetzt werden. Der Brenner ist als feinster Mikrobrenner gut regulierbar und besitzt eine abschraubbare Hülse S, die in der Figur 3 als Träger für das Porzellantiegelchen dient. Diese Stative mit allem Zubehör sind von Paul Haack, Wien, IX., Garelligasse 4, oder von Karl Schmitt, Graz, Lessingstraße 25, zu beziehen.

[54] Zur schnelleren Abscheidung und gründlicheren Durchmischung kann man mit dem Mikrobrenner erwärmen; als elektrische Heizvorrichtung, die bei der „Spurensuche" wohl zweckmäßiger ist, haben mit Widerstandsdraht umwickelte Ringe aus Knochenporzellan von 15 mm Höhe und 18 bis 20 mm lichter Weite hierfür sowie für das Eindampfen von Flüssigkeiten, die stark zum Kriechen neigen, in Mikrobechern gute Dienste geleistet. Die Ringe wurden mir von der Porzellanfabrik Gustafsberg, Schweden, angefertigt.

[55] Über die Dosierung solcher Tröpfchen vergl. die Arbeit von E. Wiesenberger, Mikrochemie, **X**, 10 (1931/32), Fig. 9 bis 11.

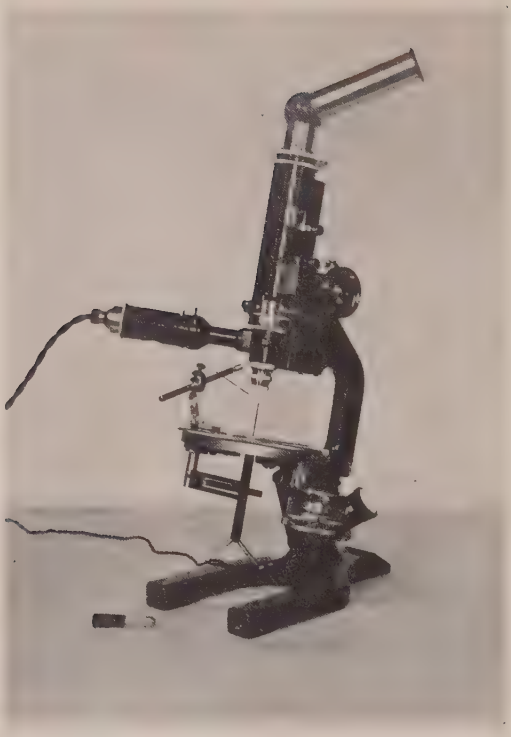


Fig. 4.
Beobachtung und Manipulieren auf der Oberfläche der Nadelelektrode im Mikroskop für mikrochemische Arbeiten (Optische Werke C. Reichert).

Fig. 5.
Oberfläche der Nadelelektrode (20mal natürliche Größe).

Während dieser letzten Operationen hat man die Flüssigkeit im Porzellantiegelchen mit Ammoniak neutralisiert, etwas konz. Schwefelsäure (zirka 0,03 ccm) zugesetzt und bei 2 Volt Spannung neuerlich elektrolysiert. Nach ungefähr einer Stunde hat sich die Kathode meist mit einem gleichmäßigen rötlichen

Niederschlag überzogen, der aber nicht immer die charakteristische Kupferfarbe aufweist. Unter Stromschluß wird die Nadelelektrode vorsichtig abgespült, neuerlich in den Kapillarhalter eingespannt und unter das Mikroskop gebracht. Nach dem Lösen des Belages auf der Kathode in HNO_3 erfolgt die Identifizierung des Kupfers am besten mit Rubeanwasserstoffsäure entweder auf der Elektrode selbst durch eine Fadenreaktion (nach P. RAY[56], 0,002 γ Cu) oder nach dem Absaugen von der Elektrode in einer Kapillare (P. RAY[56], 0,002 γ Cu) oder auf Tüpfelpapier (F. FEIGL[57], 0,006 γ Cu). Der Zusatz geringer Mengen von Harnstoff bei diesen Versuchen erscheint günstig, wurde aber nicht weiter verfolgt (Vorsicht wegen des Kupfergehaltes von Harnstoff[58]!).

Anschließend sollen noch Versuche gestreift werden, welche die Identifizierung der auf der Nadelelektrode abgeschiedenen Metalle nach dem Abdruck- und Entwicklungsverfahren von M. NIESSNER[59] zum Ziele haben. Die kapillare Wanderung der gelösten Stoffe im porösen Papier bringt bei diesem Verfahren eine solche Vergrößerung im Abdruckbild mit sich, daß dadurch oft Einschlüsse in Schliffen erkannt werden, die mit freiem Auge nicht zu sehen sind (dies neben dem eigentlichen Zweck dieses Verfahrens, dem lokalisierten Nachweis der Einschlüsse).

Die Elektrodenscheibchen (0,05 und 0,025 mm Durchmesser) der Nadelelektrode sind mit unbewaffnetem Auge in der Glasfläche gerade noch, wenn auch schwer, erkenntlich; wohl aber nicht mehr die Art der Abscheidungen. Im Abdruckbilde wird eine drei- bis fünffache Vergrößerung erzielt, und da die Spiegelung der Glasfläche wegfällt, sind die Abdrücke schon mit freiem Auge gut wahrzunehmen und außerdem bei der Wahl einer möglichst spezifisch geführten Reaktion als bestimmtes Ion identifiziert.

Auf der Nadelelektrode (0,05 mm) sind z. B. ungefähr 0,01 γ Cu abgeschieden[60]. Auf die Rückseite eines etwa 1 cm² großen Gelatinepapiers, das nach den Vorschriften von M. NIESSNER mit verdünntem Ammoniak getränkt ist[61] und mit

[56] l. c.

[57] l. c., S. 154.

[58] R. LUCAS und FR. GRASSNER, Mikrochemie, **VI**, 116 (1928); ebenda EMICH-Festband, 197 (1930).

[59] l. c.

[60] Vergl. Fußnote 50, Seite 237.

[61] l. c., S. 20. Die Nadelelektrode von 0,7 bis 1 mm Außendurchmesser dringt in die weiche Gelatineschichte ein, die mit dem Reagens durchtränkt ist, und zerstört sie. Der Abdruck wird deshalb auf der Rückseite erzeugt und die Gelatineschichte dient sozusagen als Vorratsbehälter für die Nachlieferung des Reagens.

der Schichtseite auf einem Objektträger aufliegt, wird die Nadelelektrode nicht zu stark aufgedrückt (sie ist entweder in das Stativ (Fig. 3, S. 238) oder in den aus dem Mikroskop herausgeschwenkten Kapillarhalter (Fig. 2, S. 225) eingeklemmt). Nach 10 Minuten wird das Papier in Rubeanwasserstoffsäure gebracht; bei der Entwicklung entsteht ein schwarzbrauner Fleck, der schon mit freiem Auge zu sehen ist und den Niederschlag als Kupfer identifiziert. Die Farbtiefe und Größe des Abdruckbildes hängt von der Menge des abgeschiedenen Metalles und der Länge der Einwirkungsdauer beim Abdruck ab. Die Abdrücke besitzen dokumentarischen Wert, da sie längere Zeit aufbewahrt werden können.

Vielversprechend scheint mir der Ausbau dieser Versuchstechnik, besonders in Verbindung mit der mikrochemischen Ausführung der Arbeiten von A. Glazunov und seiner Schule[62].

Schließlich soll noch einmal hervorgehoben werden, daß durch die hier beschriebenen apparativen Hilfsmittel besonders ein sicheres Arbeiten ermöglicht wird, welches Anlaß geben dürfte, sich mit den auf diesem Wege zu lösenden Problemen öfter und näher zu befassen. Vor allem ist nun die Inangriffnahme quantitativer Probleme in dieser Weise dem Möglichen nähergerückt und ermuntern hierzu z. B. die von R. Lucas und Fr. Grassner[63] gesammelten Erfahrungen bei der Bestimmung von Kupfer- und Bleispuren (Kristallfällung!).

Die Scheu, mit so feinen (und später vielleicht noch feineren) Nadelelektroden zu arbeiten, scheint mir nicht berechtigt zu sein; jedenfalls führe ich als Beispiel an, daß bei rund 200 Versuchen in der letzten Zeit keine der Elektroden durch Bruch verlorengegangen ist.

Das Grundprinzip der erwähnten Methodik — die elektrolytische Abscheidung auf Platinscheibchen in einer eben geschliffenen Glasfläche — hat sich aber nicht nur dann bewährt, wenn allerkleinste Stoffmengen auf dünnen Drähten (0,025 bis 0,1 mm) abgeschieden werden, sondern auch in Fällen, wo Platindrähte von größerem Durchmesser (0,1 bis 0,4 mm) für die Abscheidung größerer Mengen (1 bis 100 γ) Verwendung finden.

[62] A. Glazunov, Chem. Listy Vědu Průmysl, **25**, 352 (1931), durch C., **103**, I, 1398 (1932); Chim. et Ind., **27**, Sond.-Nr. 3401 (1932), durch C., **103**, I, 3156 (1932). Ed. Arnold, Chem. Listy Vědu Průmysl, **27**, 73 (1933), durch C., **104**, I, 2845 (1933).

[63] l. c.

So beeinflußt man z. B. durch die elektrolytische Abscheidung eines in größeren Mengen vorhandenen Stoffes B neben seiner Isolierung das Grenzverhältnis für einen anderen, in geringen Mengen anwesenden Stoff A in so günstiger Weise, daß der Nachweis von A nunmehr gelingt, der sonst durch die Anwesenheit des Stoffes B verhindert worden wäre[64]. Wir haben es also mit dem umgekehrten Verfahren von früher zu tun (S. 234 bis 236), nämlich zuerst die elektrolytische Abtrennung des in größeren Mengen vorhandenen Stoffes in einem Zwischenstadium zur Identifizierung der Spur.

Das saubere Arbeiten mit der Nadelelektrode, die in die verschiedensten Gefäße eingetaucht wird, sei es in Kapillaren, Spitzröhrchen, Porzellantiegel, Mikrobecher oder sei es sogar in Tropfen auf der Tüpfelplatte und auf dem Objektträger, die für viele Ionen günstigen Abscheidungsbedingungen ohne Zusatz neuer Reagenzien, wahrscheinlich auch die Vermeidung des Mitreißens von in sehr geringer Menge anwesenden Kationen, sind einige der Vorteile, die für eine allgemeinere Anwendung dieser Methode sprechen und die etwa ausführlichere Wiedergabe einiger Versuche und Anregungen an dieser Stelle rechtfertigen.

Die Versuche zu der vorliegenden Abhandlung wurden im mikrochemischen Untersuchungslaboratorium des Herrn Dr. Erich R. Welti in Bern (Schweiz) begonnen und an der Kärntner Landes-Versuchs- und Lebensmittel-Untersuchungsanstalt in Klagenfurt, Vorstand Dr. Josef Pirker, zu Ende geführt; ich möchte auch an dieser Stelle den beiden Herren für ihr liebenswürdiges Entgegenkommen in allen Belangen meinen allerbesten Dank sagen.

Zusammenfassung.

Es wird neues Zubehör zu einem Mikroskop für mikrochemische Arbeiten beschrieben, das einer möglichst vielseitigen Verwendung fähig ist. Die Bestandteile können an einem schon vorhandenen Instrument leicht und rasch auswechselbar an-

[64] Ähnliche Elektrolysen, allerdings nicht mit der Nadelelektrode, wurden z. B. für die Abscheidung des Zinks von den übrigen Ionen der Schwefelammongruppe unternommen. A. Benedetti-Pichler, Ztschr. analyt. Chem., **70**, 268 (1927).

gebracht werden und erleichtern viele der Operationen bei der Vorbereitung der Substanz für die Analyse, bezw. bei der Ausführung von Identifizierungsreaktionen unter dem Mikroskop.

Neu sind vor allem ein Kapillarhalter und ein einfacher mikrochemischer Manipulator, deren Handhabung und Anwendungsmöglichkeiten an einigen Beispielen und Abbildungen erläutert werden. Auf ihren Nutzen im Anfängerunterricht und bei Demonstrationen sowie Projektionsversuchen wird hingewiesen.

Ganz besonders bewährten sich diese apparativen Hilfsmittel bei der Ausführung von qualitativen mikroelektrolytischen Versuchen mit einer verbesserten Nadelelektrode nach der von H. J. Brenneis angegebenen Methodik. Auf einige apparative und methodische Neuerungen (Mikrouniversalstativ, Anwendungsbereich der Methode. Versuchstechnik usw.) wird näher eingegangen.

Über eine einfache tyndallmetrische Trypsinbestimmungsmethode.

Von

E. Herzfeld.

Aus dem Mediz.-chem. Institut der Mediz. Universitätsklinik Zürich.

(Eingelangt am 15. September 1933.)

Über die bisher geübten Trypsinbestimmungsmethoden finden sich ausführliche Angaben bei C. Oppenheimer: Die Fermente und ihre Wirkungen, Bd. II, S. 848 bis 861, 1926, ferner bei P. Rona, Fermentmethoden (S. 233 bis 261, sowie Ergänzung 1926). Ohne auf die Kritik dieser Methoden einzugehen, soll im folgenden ein einfaches, rasch ausführbares Verfahren beschrieben werden.

Das Prinzip der Methodik beruht darauf, daß man in eine Eiweißlösung, welche mit einem bestimmten Tyndallwert charakterisiert ist, bei der gleichen Pufferung fallende Trypsinmengen bringt und nach zweistündiger Bebrütung die doppelte Abnahme des Tyndallwertes bestimmt. Auf dem gleichen Prinzip wurde vom Verfasser schon früher[1] eine einfache, für Serienbestimmungen gut geeignete Pepsinbestimmungsmethode ausgearbeitet. Die Einstellung der Empfindlichkeitsgrenze der Pepsinwirkung erfolgte mit Northrop's kristallisiertem Pepsin. Die erhaltenen Werte können direkt in Milligramm kristallisierten Pepsins ausgedrückt werden.

Ausführung der tyndallmetrischen Untersuchung.

Es wurde zunächst versucht, die gleiche Serumeiweißlösung (20 ad 100 ccm) für die Trypsinbestimmung anzuwenden. Die erhaltenen Ausschläge waren aber so gering, daß man die Eiweißlösung fortschreitend verdünnen mußte, um die Abnahme der Tyndallwerte deutlicher beobachten zu können. Erst bei der zehnfach verdünnten Eiweißlösung mit einem Anfangstyndallwert von zirka 1,2 bis 1,5 mm konnten auch schwache Trypsinwirkungen registriert werden. Sodann wurde der Einfluß der Pufferung geprüft, wobei sich zeigte, daß bei Anwendung einer frisch hergestellten 1%igen $NaHCO_3$-Lösung als Verdünnungsflüssigkeit die gleichmäßigsten Resultate erhalten werden konnten. Zur Einstellung der Empfindlichkeitsgrenze der Trypsinwirkung konnte zunächst auch

[1] Biochem. Ztschr., **232**, H. 1/3, 78 (1931), **251**, H. 4/6, 384 (1932).

das kristallisierte Trypsin von NORTHROP untersucht werden[2]. Das Präparat wurde als Ammonsulfatfällung in einer Pasteform eingesandt.

Aus einer daraus in 1%ig. $NaHCO_3$-Lösung hergestellten 1‰ Lösung wurde eine Verdünnungsreihe bereitgestellt. Jedes Röhrchen der Reihe erhielt 1 ccm der oben angegebenen Eiweißlösung und wurde dann sofort und nach zweistündigem Stehen im Brutschrank tyndallmetriert. Es ergab sich der Grenzwert von 0,003, das heißt $3\,\gamma$ der Paste waren imstande, den Anfangstyndallwert von 1,5 mm zu verdoppeln. Außerdem wurde die Paste im Vakuumexsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, von der Trockensubstanz 200 mg in 100 ccm 1%ig. $NaHCO_3$-Lösung aufgelöst und, wie oben beschrieben, weiterverarbeitet. Es resultierte hierbei der Wert von 0,0005 mg, das heißt $5\,\gamma$ vermochten in der Eiweißlösung eine Verdauung hervorzurufen, welche die Verminderung des Tyndallwertes zur Hälfte (Verdoppelung der Schichtdicke) bewirkte. Besonders interessant waren die Versuche mit einem von der Firma Krause-Medico, München, in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellten Trypsinpräparat, welches durch wiederholte Reinigung eine außerordentlich hohe Wirksamkeit aufwies. Ausgehend von einer 0,1%ig. Lösung in 1%ig. Na-Bicarbonat zeigte sich eine Wirksamkeit, welche noch einer Menge von 0,0000075 mg = 0,0075 γ = 7,5 mγ zukam. Sowohl das kristallisierte Trypsin von NORTHROP wie auch das hochwirksame Krause-Medico Trypsin waren amylasefrei. Dagegen enthielten beide Präparate ungefähr in der gleichen Menge Lipase[3]. Wenn man also nur die Hälfte der wirksamen Substanz auf Trypsin beziehen dürfte, so hätte man doch die Möglichkeit, auf dieser Grundlage die Beurteilung der Größenordnung tryptischer Wirkungen anzugeben. Verfasser möchte als Empfindlichkeitsgrenze

[2] Ich möchte bei dieser Gelegenheit Herrn PROF. DR. J. NORTHROP für die freundliche Überlassung des Präparats meinen besten Dank aussprechen.

[3] Herr PROF. DR. JOHN NORTHROP äußerte sich auf eine diesbezügliche Anfrage in dem Sinne, daß er unter Anerkennung der Zweckmäßigkeit und Exaktheit obiger Methode annimmt, daß reine Trypsinlösungen in bicarbonatalkalischem Milieu weniger haltbar sind oder leichter von ihrer Wirksamkeit einbüßen als Handelspräparate. Außerdem dürfte, nach seiner Meinung, die höhere Wirksamkeit bei den nicht genügend gereinigten Trypsinpräparaten auch von anderen noch vorhandenen Fermenten verursacht sein.

mit der angegebenen Methodik den Wert von 3,75 mγ vorschlagen.

Eine tyndallmetrische Trypsinbestimmung gestaltet sich in folgender Weise: Von der zu prüfenden Körperflüssigkeit oder einem bikarbonatalkalischen Auszug aus der gewogenen Menge eines Organ- oder Pankreaspräparats wird 1 ccm in das erste und zweite Röhrchen der Reihe gebracht, in welcher jedes Röhrchen, mit Ausnahme des ersten, je 1 ccm einer frisch hergestellten 1%ig. $NaHCO_3$-Lösung enthält. Man vermischt den Inhalt des zweiten Röhrchens, pipettiert davon 1 ccm in das dritte Röhrchen und wiederholt dies solange, bis das zehnte oder bei hoher Wirksamkeit das fünfundzwanzigste Röhrchen erreicht ist. Sodann bringt man in jedes Röhrchen je 1 ccm einer frischen Eiweißlösung, welche in folgender Weise hergestellt wird:

Man verdünnt 20 ccm Rinderserum bis 100 ccm mit destilliertem Wasser, bringt diese Lösung in ein Becherglas und erhitzt über kleiner Flamme unter Umrühren mit einem Glasstab mit Gummiende bis zum Sieden, wobei tropfenweise soviel 1%ig. Essigsäure (maximal 2 ccm) zugefügt wird, bis eine grobdisperse, stark opalisierende kolloide Lösung ohne nennenswerte Flockenbildung entsteht. Diese Lösung wird durch Watte heiß in einen ERLENMEYER-Kolben filtriert und ist nach Abkühlung (Wasserleitung) direkt für Pepsinbestimmungen verwendbar. Der häufigste Anfangstyndallwert derselben beträgt 0,3 mm. 10 ccm dieser Lösung mit destilliertem Wasser bis 100 verdünnt, zeigt am häufigsten Tyndallwerte, welche zwischen 1,2 bis 1,5 mm liegen.

Man vermischt den Inhalt der Röhrchen, stellt für zwei Stunden in den Brutschrank und liest nachher die Tyndallwerte der einzelnen Röhrchen ab. Der Anfangstyndallwert von etwa 1,5 mm kann infolge verdauender Wirkung des Trypsins bis auf 25 mm ansteigen und fällt dann zur Norm ab. Als Grenzwert der Trypsinwirkung wird diejenige Trypsinmenge angenommen, welche imstande ist, den Anfangstyndallwert zu verdoppeln, bezw. die Intensität des Tyndallkegels auf die Hälfte zu vermindern. Auf diese Weise gelingt es, den oben angegebnen Grenzwert zu bestimmen.

Daß solchen tyndallmetrisch feststellbaren Ausschlägen tatsächlich tryptische Abbauwirkungen entsprechen, kann sehr leicht bewiesen werden. Man versetzt eine solche, im Tyndallmeter unter-

suchte Röhrchenreihe mit je 1 ccm einer 25 %ig. Sulfosalicylsäurelösung (unter Ansäuern mit Essigsäure) vermischt den Inhalt der Röhrchen und kann beobachten, daß die ersten (vier) Röhrchen nur schwache, beim Erwärmen völlig verschwindende Trübungen zeigen, die übrigen Röhrchen aber mit fallenden Trypsinmengen steigende und in der Wärme nicht verschwindende flockige Abscheidungen enthalten. Die beim Erwärmen verschwindende Trübung zeigt die Anwesenheit von Albumosen an. Die Peptone können in folgender Weise identifiziert werden: Man neutralisiert den Inhalt der Röhrchen genau, koaguliert die etwa vorhandenen Eiweißkörper, filtriert durch kleine Filter, fügt zum Filtrat 0,5 ccm konzentrierte Natronlauge sowie 0,2 ccm Kupfersulfatlösung (1 : 500). In den Proben, welche mit Sulfosalicylsäure keine nennenswerte Trübung gaben (also eiweiß- und albumosenfrei waren), trat deutlich Violettfärbung auf.

Es mögen folgende Beispiele die Ablesungsresultate im Tyndallmeter illustrieren. In beiden Fällen sind die Objekte allein sowie nach Zugabe von Kinase (Willstätter, Waldschmidt-Leitz, Dunaiturria, Küstner, Literatur bei Peter Rona, Fermentmethoden, Ergänzung zu S. 256) und Kinase allein angesetzt worden. Zur Herstellung der Kinase bewährte sich bisher am besten die Rinderdarmschleimhaut. Der Darm von frisch geschlachteten Tieren wurde sorgfältig gewaschen, mit Filterpapierstücken von überschüssigem Wasser befreit, vorsichtig abgeschabt, rasch getrocknet, in einer Reibschale zu einem feinen Pulver zerrieben und im Exsikkator aufbewahrt. 0,5 g dieses Pulvers werden jeweils in 50 ccm 1 %ig. $NaHCO_3$-Lösung aufgelöst, zentrifugiert, von der klaren Lösung in 1 %ig. $NaHCO_3$-Lösung eine Verdünnungsreihe hergestellt (1. Röhrchen 1 ccm, 2. Röhrchen 1 ccm — 1 ccm $NaHCO_3$, alle anderen Röhrchen 1 ccm $NaHCO_3$, dann vom 2. Röhrchen weiter verdünnt), von welcher 0,3 ccm in die entsprechenden Röhrchen der Trypsinverdünnungsreihe gebracht werden. Zur Kontrolle wird noch die Kinaseverdünnungsreihe ebenso in Mengen von 0,3 ccm allein in $NaHCO_3$ angesetzt. Selbstverständlich erhält jedes Röhrchen der Trypsinreihe je 0,3 ccm $NaHCO_3$-Lösung. Schließlich werden alle Röhrchen mit 1 ccm der Eiweißsubstratlösung versetzt. Nach zwei Stunden Stehen im Brutschrank können folgende Ausschläge abgelesen werden (Anfangstyndallwert = 1,4 mm):

Fermentpräparat H, 1%ig. Lösung.

allein		mit Kinase		Kinase allein	
mm	mg	mm	mg	mm	mg
4,4	0,004	3,0	0,008	10,3	0,00012
6,5	0,002	6,2	0,004	22,8	0,00006
16,1	0,001	8,9	0,002	24,2	0,00003
25	0,0005	16,2	0,001	22,7	0,000015
25	0,00025	25	0,0005	7,9	0,0000075
25	0,000125	25	0,00025	3,8	0,00000375
25	0,00006	25	0,000125		
25	0,00003	25	0,00006	1,8	
9,2	0,000015	25	0,00003	1,4	
4,3	0,0000075	7,0	0,000015		
2,8	0,00000375	4,0	0,0000075		
		2,8	0,00000375		
2,0					
1,7		2,0			
1,4		1,8			
		1,5			
		1,4			

Aus obiger Zusammenstellung ist ersichtlich, daß die tryptische Wirkung von 1 ccm der 1%ig. Lösung 0,004 mg und in 100 ccm der Lösung 4 mg Krause-Medico-Ferment entspricht. Die aktivierte Lösung zeigte eine Zunahme von 4 mg, wovon nur 0.012 mg der Kinaselösung abzuziehen wäre. Mit dieser Versuchsanordnung gelingt es demnach sehr leicht, sowohl das fertige Trypsin wie auch daneben den nicht aktivierten Trypsinogenanteil quantitativ zu erfassen. Bemerkenswert ist der Befund, daß sowohl das kristallisierte Trypsin von NORTHROP wie auch das Krause-Medico-Trypsin durch Kinasezusatz nicht aktiver geworden ist. Diese Präparate enthalten demnach nur aktiviertes Trypsin.

Im Duodenalsaft (siehe letzte Tabelle) allein kann das schon aktive Trypsin 2 mg% Krause-Medico-Ferment gleichgestellt werden. Nach der Aktivierung des Trypsinogens mit Kinase steigt der Wert auf 8 mg%, also eine Zunahme von 6 mg%, wobei nach Abzug der Kinasewirkung allein 7.988 mg% verbleiben.

Bei der Untersuchung verschiedener Körperflüssigkeiten, wie

Blut, Punktate, Speichel, Magensaft, Urin, ist es zweckmäßig, zunächst durch Zugabe von festem $NaHCO_3$ die etwa vorhandene Azidität abzustumpfen und dann noch soviel zuzufügen, bis die Konzentration von 1% erreicht ist. Die aus diesen Lösungen in 1%ig. $NaHCO_3$ hergestellten Verdünnungsreihen können dann, wie oben beschrieben, mit und ohne Kinase angesetzt werden.

Von den bisher untersuchten Körperflüssigkeiten zeigte der Speichel sowie der Magensaft zuweilen sehr geringe tryptische Wirkung, dagegen fehlte eine solche im Blute, in Pleura- und Ascitespunktaten und Urinen.

Ungleich fielen die Versuchsergebnisse bei der Prüfung der antitryptischen Wirkung aus. Man löst ein geprüftes Trypsinpräparat in der auf 1% $NaHCO_3$ eingestellten Körperflüssigkeit auf und bestimmt die tryptische Wirkung in der oben geschilderten Weise. Die stärksten antitryptischen Wirkungen traten im Blutserum auf, weniger stark waren solche im Punktat und häufig fehlten diese im Magensaft und Urin völlig.

Auch im Duodenalsaft läßt sich ähnlich die Fermentwirkung bestimmen.

Duodenalsaft allein		Duodenalsaft mit Kinase		Kinase allein	
mm	mg	mm	mg	mm	mg
15,0	0,002	14,0	0,008	16,7	0,00012
16,9	0,001	15,4	0,004	19,7	0,00006
19,3	0,0005	16,0	0,002	11,0	0,00003
22,3	0,00025	19,5	0,001	4,9	0,000015
25	0,000125	23,0	0,0005	3,5	0,0000075
25	0,00006	17,0	0,00025	2,9	0.00000375
19,2	0,00003	16,3	0,000125	2,0	
8,2	0,000015	13,0	0,00006	1,5	
5,3	0,0000075	4,9	0,00003	1.4	
2,8	0,00000375	3,4	0,000015		
1,8		3,3	0,0000075		
1,4		2,8	0.00000375		
		1,9			
		1,6			
		1,4			

Über die mikrojodometrische Bestimmung des Eisens. (Eisengehalt von Schilddrüsen.)

Von

Johann Straub.

Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Debrecen.

(Eingelangt am 16. September 1933.)

Zur volumetrischen Bestimmung der in verschiedenem biologischen Material (Blut, Harn, Kot usw.) vorhandenen geringen Mengen von Eisen hat A. Neumann[1] eine jodometrische Methode ausgearbeitet, welche in einer durch mehrere Autoren (Treadwell, Abderhalden, Hanslian u. a.) modifizierten Form als gut verwendbare Methode in der Literatur[2] angeführt wird.

Nach der Neumann'schen Methode wird das Untersuchungsmaterial auf nassem Wege mit einem Gemische von Schwefelsäure und Salpetersäure verascht und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Zur Abscheidung gelösten Eisens wird Zinkreagens ($ZnSO_4 + Na_2HPO_4 + H_2SO_4$) und soviel Ammoniak zugegeben, daß der entstandene Niederschlag sich eben auflöst. Der beim Kochen der Lösung sich abscheidende Zinkammoniumphosphatniederschlag reißt selbst sehr geringe Eisenmengen mit. Der dekantierte Niederschlag wird in Salzsäure gelöst, eine abgemessene Menge der salzsauren Lösung mit Stärkelösung gemischt, hierauf durch anhaltendes Einführen von Kohlendioxyd die Luft aus der Lösung verdrängt, in derselben Jodkalium gelöst und das ausgeschiedene Jod nach Verlauf von 20 Minuten mit n/250-Thiosulfatlösung titriert. Sobald die blaue Farbe verschwindet, wird wieder

---

[1] Ztschr. physiol. Chem., **37**, 115 (1902/03); **43**, 32 (1904/05).

[2] H. Thierfelder. Handb. d. physiol. u. pathol. Chem. Analyse. S. 660. Berlin (1924).

Kohlendioxyd in die Lösung eingeleitet und gegebenenfalls noch Thiosulfatlösung zugegeben. Falls ein weiteres Nachblauen stattfindet, so ist die Titration mit einer neuen Menge der salzsauren Lösung unter Anwendung von mehr Jodkalium zu wiederholen. Es ist am zweckmäßigsten, wenn die Menge des bestimmenden Eisens 2 bis 3 mg beträgt; ist sehr wenig Eisen vorhanden, so werden zur Zersetzungsflüssigkeit 10 ccm einer 2 mg Eisen enthaltenden $FeCl_3$ Lösung zugegeben und der Thiosulfatverbrauch derselben aus dem Resultate der Titration abgezogen.

Die ziemlich umständliche und langwierige Methode von Neumann ist nach meinen Erfahrungen zur Bestimmung von sehr wenig Eisen (weniger als 0,05 mg) nicht anwendbar. Über ähnliche Erfahrungen berichtet W. F. Donath[3] und empfiehlt zur Bestimmung sehr kleiner Mengen Eisens die kolorimetrische Rhodanmethode.

Die als Grundlage der jodometrischen Bestimmung des Eisens dienende Reaktion ($2\,Fe^{\cdots} + 2\,J^{-} \rightleftarrows 2\,Fe^{\cdot\cdot} + J_2$) ist reversibel und im quantitativen Verlauf nur durch Einhalten gewisser Bedingungen möglich. In der Literatur[4] sind verschiedene Vorschriften angegeben, nach welchen die jodometrische Bestimmung des Eisens mit gutem Erfolge ausgeführt werden kann. Nach den Untersuchungen J. M. Kolthoff's kann eine solche Vorschrift, welche im Falle verschiedener Eisenkonzentrationen gleicherweise verwendbar wäre, nicht gegeben werden. Die Vorschriften Kolthoff's[5] und anderer beziehen sich aber nur auf höhere Eisenmengen. Zur jodometrischen Bestimmung von in der Asche vegetabilischer und tierischer Stoffe vorhandenen geringen Eisenmengen gibt M. Ripper[6] eine Vorschrift, welche auch C. Meineke[7] als anwendbar erklärt hat. Ripper führt die Titration mit n/100-Thiosulfatlösung aus (1 ccm 0,01-$Na_2S_2O_3$ = 0,5584 mg Fe). Um die Empfindlichkeit der Bestimmung zu erhöhen, führte ich dieselben nach

[3] Mededeel. v. d. dienst. d. volksgezondh. in Nederlandsch. Indie, 184 (1926); zit. nach Z. Stary, Mikrochemie, XII, 355 (1932/33).

[4] Literatur bei A. Rupisuli, Nachweis, Bestimm. u. Trennung d. chem. Elemente, S. 228, Bern (1926); J. M. Kolthoff, Die Maßanalyse, Teil II, S. 405, Berlin (1928).

[5] l. c., S. 406.

[6] Ztschr. analyt. Chem., 35, 628 (1896).

[7] Ztschr. analyt. Chem., 39, 320 (1900).

der Vorschrift RIPPER's mit verdünnteren (n/250 und n/500) Thiosulfatlösungen aus, die Resultate waren aber nicht befriedigend.

Nach eingehenden Versuchen ist es mir gelungen, die Bedingungen zu finden, unter denen sehr geringe Mengen Eisen mit möglichster Genauigkeit jodometrisch bestimmbar sind, wodurch auch Eisen in biologischen Stoffen einfacher und rascher bestimmt werden kann als durch die Methode von NEUMANN.

Zu der in einem 100-ccm-ERLENMEYER-Kolben befindlichen Probelösung, deren Volumen von 8 bis 9 ccm, niemals aber mehr als 10 ccm betragen soll, werden 2 bis 3 Tropfen konz. Salzsäure sowie 1 bis 2 g Jodkalium zugegeben und nach Zusatz einiger Tropfen Stärkelösung das ausgeschiedene Jod innerhalb 1 bis 2 Minuten mit n/500-$Na_2S_2O_3$-Lösung (1 ccm n/500-$Na_2S_2O_3$-Lösung = 0,1117 mg Fe) titriert. Sollte die titrierte Lösung innerhalb 3 Minuten wieder blau werden, so wird Thiosulfatlösung bis zur vollkommenen Entfärbung zugegeben und die Titration als beendet betrachtet.

Auf diese Weise habe ich bekannte Eisenmengen (0,5 bis 0,01 mg) titriert und die Bestimmungen auch parallel nach dem Verfahren von NEUMANN ausgeführt; von den erhaltenen Resultaten sind einige in Tabelle I mitgeteilt.

Tabelle I.

Gegeben	Gefunden		Methode von Neumann	
Fe mg	Fe mg	% des gegebenen Fe	Fe mg	% des abgewogenen Fe
0,500	0,497	99,4	0,505	101,0
0,250	0,248	99,4	0,257	102,8
0,125	0,125	100,0	0,128	102,4
0,050	0,052	104,0	0,059	110,8
0,025	0,024	96,0	0,034	136,0
0.010	0,011	110,0	0,021	210,0

Die in Tabelle I enthaltenen Werte bestätigen die Brauchbarkeit meiner Methode und zeigen, daß die Methode NEUMANN's zur Bestimmung von Eisenmengen unter 0,05 mg nicht geeignet ist.

Da ich mich mit der Untersuchung der Aschenbestandteile verschiedener Schilddrüsen eingehend befaßte, bestimmte ich unter

anderen auch den Eisengehalt derselben, und zwar mit beiden Verfahren. Die Resultate sind in Tabelle II angeführt und es ist ersichtlich, daß, sofern es sich um größere Eisenmengen handelt, die NEUMANN'sche Methode brauchbar ist, was ich auch bei Versuchen mit reinen Eisenlösungen feststellen konnte.

Tabelle II.

Nr.	Bezeichnung und Abstammung der Schilddrüse		Eisengehalt von 1 g roher Schilddrüse[8] mg	
			nach meiner Methode	nach der Neumann-Methode
1	147	Freiburg in Breisgau	0,222	0,228
2	442		0,203	0,203
3	86		0,179	0,182
4	676		0,168	0,167
5	106		0,131	9,135
6	985		0,119	0,123
7	31	Comitat Hajdu (Ungarn)	0,082	0,081
8	104		0,062	0,062
9	30		0,027	0,023
			0,028	0,010
10	27		0,020	0,007
			0,019	0,031
				0,019

Zum Aufschluß der Schilddrüsen zwecks anschließender Eisenbestimmung wurden die beiden nachstehend beschriebenen Verfahren eingehalten, die auch zum Aufschluß anderer biologischer Materialien verwendbar sind.

1. Von der getrockneten, feinpulverisierten Schilddrüse wurden 0.5 g in eine Platinschale abgewogen und im elektrischen Glühofen auf die übliche Weise verbrannt. Die kohlenfreie Asche wurde in 2 bis 3 ccm konz. warmer Salzsäure gelöst, die Lösung in eine kleine Porzellanschale mit flachem Boden gespült, 2 bis 3 Tropfen Perhydrol zugegeben und anfangs mit einem Uhrglas bedeckt, zur vollkommenen Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit 2 bis 3 Tropfen konz. Salzsäure durchgefeuchtet, mit 8 bis 9 ccm

[8] Die unter Nr. 1 bis 8 mitgeteilten Angaben sind Durchschnittswerte von miteinander gut übereinstimmenden Parallelbestimmungen.

Wasser in einen 100-ccm-ERLENMEYER-Kolben gespült und das vorhandene Eisen auf die beschriebene Weise titriert.

2. Von der getrockneten und feinpulverisierten Schilddrüse wurden 0,5 g in einem 100-ccm-KJELDAHL-Kolben abgewogen, 8 bis 100 ccm rauchende Salpetersäure zugegossen und zunächst vorsichtig und gelinde, später stärker bis zur Verkohlung des Untersuchungsmaterials erhitzt. Zum Inhalt des abgekühlten Kolbens wurden weitere 2 bis 3 ccm rauchende Salpetersäure zugegeben, bis zum Verdampfen der Salpetersäure erwärmt und nach zwei- bis dreimaligem Wiederholen dieses Vorganges ein vollkommen schneeweißer Rückstand erhalten. Zum Rückstande wurden 10 bis 12 Tropfen konz. Salzsäure zugegeben; gelinde erwärmt, der Inhalt des Kolbens wurde in eine Porzellanschale mit flachem Boden gespült und weiter auf die unter 1. beschriebene Weise verfahren.

Der Eisengehalt der auf beiderlei Verfahren vorbereiteten Schilddrüsen war übereinstimmend.

Zusammenfassung.

1. Die jodometrische Methode von A. NEUMANN ist zur Bestimmung von Eisenmengen unter 0,05 mg nicht geeignet.

2. Bei Einhaltung bestimmter Bedingungen gelingt es, kleine Eisenmengen jodometrisch zu bestimmen. Hierfür wird eine Vorschrift angegeben, die auch zur Bestimmung des Eisengehaltes biologischer Stoffe verwendet werden kann.

Eine Methode zur gravimetrischen Mikrobestimmung des Unverseifbaren.

Von

G. Gorbach und A. Sablatnög.

Aus dem Biochemischen Institut der Technischen Hochschule Graz. Vorstand Prof. F. Fuhrmann.

(*Eingelangt am 21. November 1933.*)

Zur Untersuchung von Lipoidextrakten ist die Bestimmung des Unverseifbaren gebräuchlich, welche eine Trennung von Fetten einerseits und den lipoiden Begleitstoffen anderseits ermöglicht. Hierfür sind prinzipiell zwei Methoden anwendbar. Man bestimmt entweder maßanalytisch die für die Verseifung der Fette notwendige Laugenmenge und ermittelt durch Rechnung den unverseifbaren Anteil oder man extrahiert nach der Verseifung mit einem passenden Lösungsmittel das Unverseifbare und bestimmt dieses gravimetrisch. Der rascheren Durchführbarkeit der maßanalytischen Methode steht der Nachteil gegenüber, daß zur Ermittlung des Unverseifbaren eine bestimmte Fettsäure in Rechnung gestellt werden muß, was eine gewisse Unsicherheit der Werte mit sich bringt. Die gravimetrische Methode erfordert allerdings mehr Zeit, bietet aber neben dem Vorteil höherer Genauigkeit die Möglichkeit, mit Hilfe analytischer Methoden die Zusammensetzung des Unverseifbaren weiter zu erforschen. Die bekannteste gravimetrische Methode ist die nach Spitz und Hönig[1], wobei das Unverseifbare nach der Verseifung mit alkoholischer Lauge durch öfteres Ausschütteln der Seifenlösung mit Petroläther gewonnen und bestimmt wird. Daneben ist auch die Extraktion der trockenen Seife im Soxhlet und die gewichtsanalytische Bestimmung des Petrolätherextraktes üblich.

[1] A. Grün, Analyse der Fette und Wachse. (Berlin 1925), S. 205.

Im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen über die Bildungsweise der Bakterienlipoide haben wir eine Methode ausgearbeitet, die bereits in 2 bis 3 mg Lipoidextrakt brauchbare Bestimmungen des unverseifbaren Anteils gestattet. Die Dauer einer Bestimmung konnte dabei auf zirka vier Stunden herabgedrückt werden. Es ist somit möglich, bei Stoffwechselversuchen neben den Gesamtlipoidbestimmungen auch den Gehalt an lipoiden Beistoffen festzustellen. Die Methode ist selbstverständlich auch zur Untersuchung von Fetten und Ölen aller Art gleich gut brauchbar. Das Unverseifbare wurde durch Extraktion mit Petroläther in der Mikroextraktionsapparatur nach G. GORBACH[2] bestimmt. Wir arbeiteten zunächst so, daß wir mit alkoholischer Natronlauge verseiften, die erhaltenen Seifen trockneten und mit Petroläther extrahierten. Diese Versuche schlugen fehl; wir erhielten in manchen Fällen bis zu 100% zu hohe Resultate. Die Ursache des Mißerfolges lag in der Hygroskopizität des im Verseifungsrückstande noch enthaltenen Natriumhydroxyds und in der Löslichkeit der Alkaliseifen im Petroläther. Dieser Fehlerquelle begegneten wir durch chemische Umsetzung der löslichen Natronseifen in schwerer lösliche Bariumseifen und durch Überführung des Natriumhydroxyds mittels Bariumchlorid in Bariumhydroxyd. Nach Anwendung dieses Prinzips erhielten wir durchaus brauchbare Resultate. Im folgenden sind die Einzelheiten des Verfahrens mitgeteilt.

Zur Bestimmung genügen im allgemeinen 2 bis 3 mg des Fettes, bezw. Öles. Höhere Einwaagen erfordern längere Verseifungs- und Extraktionszeiten. Sie sind aber in jenen Fällen zu empfehlen, wo der Gehalt an Unverseifbarem nur 2% und darunter beträgt, weil sonst bereits die Grenzen der Wägbarkeit erreicht sind und die Werte durch die Wägefehler unsicher werden. Zur Einwaage löst man die Probe am besten in Toluol und entnimmt von dieser Lösung mit Hilfe einer Mikropipette einen etwa 2 bis 3 mg entsprechenden Anteil, welcher in das kleine Verseifungskölbchen A der Fig. 1 einpipettiert wird. Nach Entfernung des Toluols im Vakuum bis zur Geruchlosigkeit wird das genaue Gewicht des Fettrückstandes auf der Mikrowaage festgestellt. Das Verseifungskölbchen A hat einen Fassungsraum von 1 bis 1½ ccm und besitzt seitlich einen Glasfortsatz zum Anfassen mit einer Pinzette. Man

[2] G. GORBACH, Mikrochemie, **XII**, 161 (1932).

bringt das Kölbchen nun in ein zweites größeres und weiteres Außengefäßchen B (Fig. 1). Letzteres vermeidet Verluste während der Verseifung, da das Verseifungsgemisch nicht selten an den

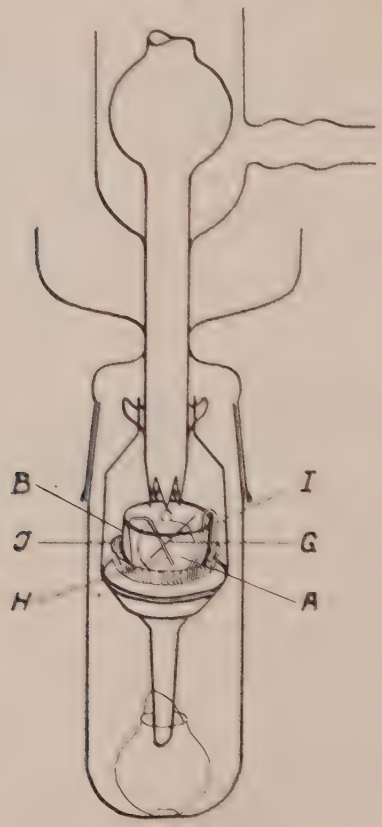


Fig. 1.

Wänden hochsteigt. Nun versetzt man das gewogene Fett im Verseifungskölbchen A mit 0.4 bis 0.6 ccm eines Gemisches von zwei Teilen normaler alkoholischer Natronlauge und einem Teil Toluol und stellt das Ganze auf einen PREGL'schen Trockenblock C. Unter Zwischenlage eines Gummiringes stülpt man dann über beide Gefäßchen einen kleinen Mikrokühler E (Fig. 1) und preßt ihn mit

einer Klammer an den Trockenblock. Hierauf bringt man den Trockenblock C mit Hilfe eines Mikrobrenners langsam auf eine Temperatur von 120 bis 130°. Durch Einhalten dieser Temperatur, welche von einem im Block angebrachten Thermometer abgelesen werden kann, läßt sich die Verseifung nahe am Siedepunkt des Verseifungsgemisches durchführen. Ein Kochen des Reaktionsgemisches soll jedenfalls vermieden werden, da sonst die Gefahr des Verspritzens besteht. Nach einer Stunde ist die Verseifung auch bei schwer verseifbaren Fetten vollständig. Man entfernt nun den Rückflußkühler, dampft das Alkohol-Toluolgemisch nahezu ab und setzt nun 1 ccm einer kalt gesättigten wäßrigen Barytlösung, welche noch 2% $BaCl_2$ enthält, zu. Hierauf wird die Lösung ohne zu kochen fast bis zur Trockene eingedampft. Das Eindampfen kann man wesentlich beschleunigen, wenn man die gebildeten Karbonathäute von Zeit zu Zeit mit einem etwa 2 cm langen und ½ mm dicken Glasstäbchen zerstört. Das Stäbchen wird mitextrahiert, um Substanzverluste zu vermeiden. Nach einer halben Stunde ist die Lösung gewöhnlich fast zur Trockene eingedampft; man vermeidet aber die vollständige Trocknung, weil das Unverseifbare meist temperaturempfindliche Substanzen enthält, die dabei verändert würden. Die vollständige Trocknung wird im Vakuum bei 30 bis 50° vorgenommen. Zu diesem Zweck hebt man das Außengefäßchen B samt dem Verseifungskölbchen A mit einer Pinzette vom Trockenblock und bringt es in einen heizbaren Vakuumexsikkator. Man trocknet bei der angegebenen Temperatur eine Stunde lang.

Nun ist das Seifengemisch für die Extraktion vorbereitet. Für diese verwenden wir die bereits erwähnte Mikroapparatur[3], welche in Fig. 2 abgebildet ist. Als Extraktionsmittel dienen niedrig siedende Fraktionen von Petroläther. Die Siedegrenzen sollen nicht weiter als 5° sein, da die Extraktionsapparatur nur dann einwandfrei arbeitet. Der Petroläther wird vor Gebrauch mit metallischem Natrium vollständig wasserfrei gemacht. Zu Beginn der Extraktion bringt man das Verseifungskölbchen A mit B auf ein Donau'sches Platinfilterschälchen[4] J oder auf ein gleich großes Schälchen aus Filtrierpapier, welches man durch Pressen von runden Filtrierpapierscheibchen (Schleicher und Schüll. Nr. 602 oder 598) mit

[3] loc. cit.

[4] J. Donau. Monatsh. Chem., **60**, 129 (1932).

einem passenden Stempel auf einem Gummiblock selbst herstellen kann. Bevor man das Ganze auf die Mitte des Glasfrittertrichterchens schiebt (siehe Fig. 2), setzt man mit Hilfe einer Pinzette

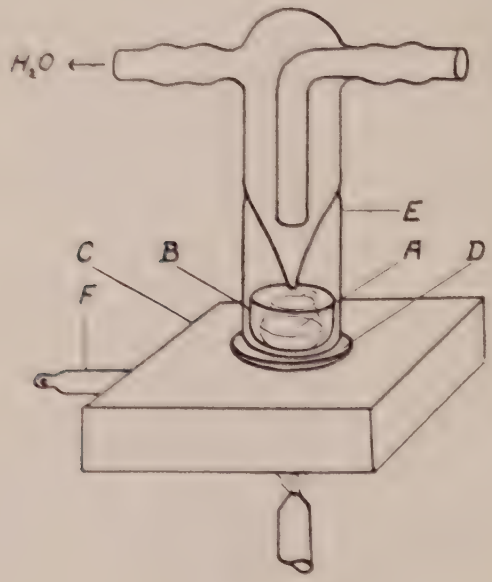


Fig. 2.

einen Mikroheber H in das Gefäßchen A und einen zweiten I in das Außengefäßchen B. Man erreicht dadurch ein Abhebern des Extraktionsmittels aus dem Verseifungskölbchen A in das Außengefäßchen B und von dort in das Filterschälchen J. Der Mikroheber H ist so bemessen, daß seine Abflußgeschwindigkeit geringer ist als der Tropfenfall von den Zacken des Kühlerrohres. Das Verseifungsgefäßchen bleibt dadurch während der Extraktion ständig mit Extraktionsmittel gefüllt, so daß eine gute Durchspülung des Extraktionsgutes an den Wänden gewährleistet ist. Das Lumen des Mikrohebers H soll etwa 0.2 mm betragen, während für den Heber I ein entsprechend weiteres (zirka 0.6 bis 0.8 mm) zu empfehlen ist, damit das Außengefäßchen ständig entleert wird. Statt der beiden Mikroheber leisten zwei entsprechend breit gewählte Papierstreif-

chen ebenfalls gute Dienste. Hat man die Heberchen eingebracht, so schiebt man das Ganze auf die Mitte des Glasfrittertrichterchens, pipettiert 4 ccm Petroläther in die Eprouvette der Extraktionsapparatur, in welcher sich bereits das gewogene, zur Aufnahme des Extraktes bestimmte Glaskölbchen befindet. Nun verbindet man die Eprouvette mit dem Schliff der Apparatur und heizt das Ganze mit Hilfe eines elektrischen Luftbades[5]. Die Extraktion ist nach zwei Stunden meist vollständig. Man schaltet nun die Heizvorrichtung aus. Während des Erkaltens entleert sich das Verseifungsgefäßchen durch die Mikroheber von selbst, nachdem kein Extraktionsmittel mehr zufließt. Nun nimmt man die Apparatur durch vorsichtiges Lösen des Schliffes auseinander und bringt das Kölbchen mit den gesammelten Petrolätherextrakten in einen Vakuumexsikkator. In diesem wird der Petroläther entfernt und der Rückstand noch weitere 10 Minuten bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Menge des Rückstandes ergibt das Unverseifbare. Man kann sich ohne weiteres von der Vollständigkeit der Extraktion überzeugen, wenn man das Kölbchen mit dem gewogenen Rückstand nochmals in die Extraktionsapparatur zurückbringt und die Extraktion in der beschriebenen Weise fortsetzt. Es darf beim nochmaligen Trocknen und Wägen keine Gewichtszunahme feststellbar sein.

Zu sämtlichen Wägungen haben wir die Mikrowaage nach J. Donau benützt, die neben sehr großer Genauigkeit den Vorteil rascher Wägbarkeit besitzt. Es ist selbstverständlich, daß für das beschriebene Verfahren alle gebräuchlichen Mikrowaagen ebenfalls Verwendung finden können.

Als Beleg für die Brauchbarkeit unserer Bestimmungsmethode haben wir in der nachstehenden Tabelle die Analysenwerte einiger Fettarten bei gleichzeitiger Gegenüberstellung der Resultate, welche nach der Makromethode von Spitz und Hönig erhalten werden, angegeben[6]. Die Übereinstimmung der Analysenresultate ist bei höherem Gehalt an Unverseifbarem recht befriedigend. Bei niederen Prozentsätzen werden die Werte infolge der unvermeidbaren

[5] G. Gorbach, Mikrochemie, **XII**, 167 (1933).

[6] Wir danken an dieser Stelle Herrn Dr. Roland Kunze für die Ausführung dieser Bestimmungen.

Tabelle.

Mikrobestimmungen				Makro-bestimmungen
Fettarten	Einwaage in mg	Petrol-ätherextrakt in mg	Prozentgehalt an Unverseifbarem	
Dorschleberöl	1,966	0,035	1,78	2,10
	1,484	0,027	1,82	
	3,636	0,072	1,98	
	2,172	0,045	2,07	
	2,024	0,042	2,08	
	1,103	0 024	2,18	
	2,182	0,048	2,20	
	2,652	0,061	2,30	
	2,182	0,051	2,36	
	2,698	0,064	2,28	
	2,460	0,060	2 44	
	3,089	0,076	2,46	
Hefefett	2,448	0,605	24,72	25,00
	2,373	0,588	24,78	
	2,503	0,621	24,81	
	2,032	0,507	24,96	
	2,008	0,504	25,10	
	2,448	0,616	25,17	
Spermazetöl	2,888	1,000	34,63	35,00
	2,299	0,982	34,72	
	2,470	0,860	34,82	
	2,601	0,912	35,06	
	1,986	0,698	35,15	

Wägefehler unsicher. Sie genügen jedoch praktisch in den meisten Fällen. Die Methode erscheint hiermit brauchbar zur Bestimmung des Unverseifbaren in geringen Substanzmengen.

Notiz über die Heizgranate nach Dr. Schöbel[1] für die Kohlenstoff-Wasserstoffbestimmung nach Pregl.

Von

H. Lieb.

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Graz.

(Eingelangt am 29. September 1933.)

Bei der mikroanalytischen Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs muß bekanntlich die Bleisuperoxydschicht des Verbrennungsrohres auf eine konstante Temperatur erhitzt werden, die nicht unter 170° und nicht über 200° liegen soll. Hierfür hat Pregl zunächst eine sogenannte Massivgranate aus Kupfer[2], später eine Hohlgranate aus hart gelötetem Metall angegeben, in deren zylindrischem Körper das Steigrohr mit einem Kitt aus Bleidioxyd und Glyzerin eingekittet ist. Die Nachteile dieser Hohlgranate: schwierige Reinigung und gelegentliches Undichtwerden an der Kittstelle sowie die Möglichkeit des Übersiedens der Flüssigkeit bei übermäßiger Heizung, wurden durch die von unserem Institutsmechaniker A. Orthofer verbesserte Hohlgranate behoben. Darüber hat in dieser Zeitschrift A. Verdino berichtet[3]. Diese ebenfalls metallene Hohlgranate hat sich auch bei dauerndem Gebrauch gut bewährt; denn gelegentlich auftretende Undichtigkeiten sind leicht zu beheben, und eine sinnreiche Konstruktion des Steigrohres verhindert ein Übersieden der Flüssigkeit auch bei unvorsichtiger Heizung. Als Nachteile sind zu erwähnen: das rasche Verharzen der Heizflüssigkeit (wir verwenden Dekalin oder Cymol), offenbar unter dem Einfluß der Metalloberfläche und außerdem die Schwierigkeit der Feststellung, wieviel Flüssigkeit sich im Hohlkörper befindet und ob sie wohl lebhaft und gleichmäßig siedet.

Wir kamen daher dem schon vor längerer Zeit vom Jenaer Glaswerk Schott u. Gen. an uns gestellten Ersuchen gerne nach, eine uns zur Verfügung gestellte Heizgranate aus Glas

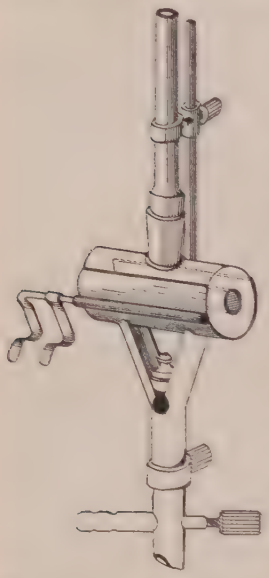
[1] Zu beziehen durch das Jenaer Glaswerk Schott u. Gen., Katalogblatt 4671/39, Gi 380.

[2] Über eine temperaturkonstante Massivgranate aus Kupfer vergl. Fr. Hernler, Mikrochemie, Pregl-Festschrift, S. 148 (1929).

[3] Mikrochemie, IX, 123 (1931).

auf ihre Eignung bei der Mikroelementaranalyse nach PREGL zu prüfen. Eine mehr als zweijährige gute Erfahrung mit dieser Heizgranate nach DR. SCHÖBEL veranlaßt mich, darüber kurz zu berichten.

Die aus durchsichtigem Duranglas gefertigte Heizgranate (vergl. Abbildung) gleicht in der Form und den Ausmaßen ziemlich genau der Metallhohlgranate nach PREGL. Der zylindrische Hohlkörper ist 70 mm lang und hat einen Durchmesser von 35 mm. Der Durchmesser des axial geführten Innenzylinders zum Durchstecken des Verbrennungsrohres beträgt 14, bezw. 6 mm; die äußere Mantelfläche trägt einen Normalschliff 2, in welchen ein etwa 35 cm langes Steigrohr eingepaßt ist. Der Hohlkörper faßt etwa 40 ccm und wird für den Gebrauch ungefähr zur Hälfte mit Dekalin oder technischem Cymol gefüllt. Die Heizgranate wird am besten ähnlich der PREGL'schen Hohlgranate auf ein Stativchen montiert und liegt zu diesem Zwecke in einer innen mit Asbestpapier ausgekleideten, halbzylindrischen Rinne aus Messing- oder Stahlblech. Um eine Drehung des Hohlkörpers um die Längsachse zu verhindern, wird das Steigrohr durch einen an der Blechrinne befestigten Messingstab mit Klemme festgehalten. Zum Einschieben des „Kupferbügels" ist an der Messingrinne ihrer ganzen Länge nach ein enges Metallrohr angelötet. Die Heizung erfolgt entweder mittels Gas durch einen in das Stativ eingebauten Mikrobrenner nach PREGL oder auf elektrischem Wege. In diesem Falle wird mittels eines Heizkörpers ein halbzylindrischer Kupferblock erhitzt, in welchem die Hohlgranate liegt. Da das Duranglas das direkte Erhitzen mit einer Gasflamme ohne Schaden verträgt, kann die Messingrinne über dem Mikrobrenner auch einen runden Ausschnitt erhalten. Das gleichmäßige Sieden kann zuverlässig dadurch bewirkt werden, daß man von Zeit zu Zeit einige Siedesteinchen der Heizflüssigkeit zusetzt.



Gegenüber der Hohlgranate aus Metall hat die gläserne den großen Vorteil, daß die Heizflüssigkeit wesentlich langsamer verharzt, daß man jederzeit sieht, wieviel Flüssigkeit im Hohlkörper enthalten ist und ob diese richtig siedet, und daß man sie auch leicht reinigen kann, wenn sie nach längerem Gebrauch infolge Verharzung der Flüssigkeit undurchsichtig geworden ist. Die Bruchgefahr ist außerordentlich gering. Wir benützen daher schon seit zwei Jahren ausschließlich die Heizgranate nach DR. SCHÖBEL.

Eine neue Tüpfelreaktion auf Kalium.

Von

N. S. Poluektoff.

Institut der seltenen Metalle in Odessa.

(Eingelangt am 17. Oktober 1933.)

Für den Kaliumnachweis nach der Tüpfelmethode wurden bisher nur solche Reaktionen angewendet, die, auf der Bildung schwer löslicher Verbindungen beruhend, auch in der qualitativen Makroanalyse Verwendung fanden. Solche Reaktionen mußten auf Uhrgläsern oder Tüpfelplatten ausgeführt werden, weil es sich um farblose oder schwach gefärbte Verbindungen handelte, deren Bildung nur durch die Ausfällung kristallinischer Niederschläge zu konstatieren ist. Es dürfte deshalb die nachstehend beschriebene Tüpfelreaktion von Interesse sein, die auf Filtrierpapier ausgeführt werden kann, da es sich um die Bildung eines farbigen, unlöslichen Kaliumsalzes handelt. Der Nachweis beruht auf der Bildung des schwerlöslichen, orangeroten Kaliumsalzes des Hexanitrodiphenylamin (p-Dipikrylamin) $(C_6H_2[NO_2]_3)_2NH$. Das Natrium- oder Ammoniumsalz dieser Verbindung, die zuerst von R. Gnehm[1] beschrieben wurde, findet als Farbstoff unter dem Namen „Aurantia" Anwendung. Das Amin stellt eine gelbe, kristallinische Substanz dar, unlöslich in Wasser und löslich in Ätznatron und Ammoniak unter Bildung einer intensiv orangeroten Lösung. Beim Ansäuern der Lösung scheidet sich Hexanitrodiphenylamin in schwefelgelben Flocken aus. Wenn zu einer schwach alkalischen Lösung des Farbstoffes irgendein lösliches Kaliumsalz zugefügt wird, so fällt orangeroter, feinkristallinischer Niederschlag aus, der als Zeichen der Anwesenheit von Kalium dienen kann. Die Reaktion ist für Kalium in Anwesenheit der Elemente der zwei letzten Gruppen

[1] Ber., 7, 1399 (1874).

spezifisch, da Li, Na, Mg, Ca, Sr und Ba diese Reaktion nicht geben. NH_4-Salze, wenn in großer Konzentration vorhanden sind, müssen vorher durch Erhitzen entfernt werden, da sie wie Kaliumsalze reagieren können. Rubidium und Caesium, die sich bei dieser Reaktion identisch mit Kalium verhalten, dürfen nicht zugegen sein.

Ausführung der Reaktion: Auf gewöhnliches Filtrierpapier oder besser auf das sogenannte Tüpfelpapier wird ein Tropfen der neutralen Probelösung aufgetragen und, b e v o r die Flüssigkeit sich in die Papierfasern eingesaugt hat[2], wird ein Tropfen der schwach alkalischen Lösung des Reagens zugefügt. Es erscheint ein orangeroter Fleck. Um zu entscheiden, ob Kalium vorhanden ist, betüpfelt man den Fleck mit ein bis zwei Tropfen 2 n-Salzsäure. In Abwesenheit von Kalium schlägt die Farbe in Schwefelgelb um, anderenfalls hinterbleibt ein mehr oder weniger intensiv rot gefärbter Fleck oder Ring. Zur Bereitung des Reagens werden 0,2 g des Farbstoffes mit 2 cm^3 1 n-Na_2CO_3 und 20 cm^3 Wasser bis zum Sieden erwärmt und nach dem Erkalten filtriert.

Erfassungsgrenze: 3,0 γ K.

Grenzkonzentration: 1 : 10.000.

Bei Anwesenheit von Li und Na wird die Empfindlichkeit der Reaktion nur wenig herabgesetzt; wir fanden folgende Grenzverhältnisse:

K a l i u m n e b e n L i t h i u m.

Erfassungsgrenze: 3,0 γ K.

Grenzverhältnis: K : Li = 1 : 130.

K a l i u m n e b e n N a t r i u m.

Erfassungsgrenze: 3,3 γ K.

Grenzverhältnis: K : Na = 1 : 180.

[2] Diese Bedingung ist von großer Wichtigkeit für die Empfindlichkeit der Reaktion.

Berichtigung.

Von

L. Rosenthaler,

Bern.

(Eingelangt am 18. September 1933.)

Auf meine Notiz[1] „Zum Nachweis des Natriums mit Uranylazetat" teilte mir Herr Prof. Schoorl, Utrecht, freundlicherweise mit, daß Natriumnitrat mit dem von ihm und Lenz zum Natriumnachweis empfohlenen Ammoniumuranylazetat normal reagiere. Die Nachprüfung ergab, daß mein Natriumnitrat auch mit dem Schoorl-Lenz'schen Reagens die beschriebene Erscheinung gab. Die infolgedessen vorgenommene Prüfung ergab, daß der von mir benützte Inhalt des als Natriumnitrat bezeichneten Gefäßes aus Kaliumnitrat bestand und es zeigte sich weiter, daß auch andere Kaliumsalze (Chlorid, Bromid, Jodid, Sulfat, Rhodanid, Permanganat, die beiden Chromate) dieselbe Reaktion gaben. Nur das saure Sulfat verhielt sich negativ. Die von mir für Natriumnitrat (und Kaliumnitrat) beschriebene Beobachtung ist also offenbar in Wirklichkeit eine Reaktion des $K^{\cdot}$ und nicht etwa eine Aussalzungserscheinung, da die Reaktion, wie erneut festgestellt wurde, mit Ammonnitrat und Ammonchlorid nicht eintritt[2].

[1] Mikrochemie, **XIII**, 83 (1933).

[2] Diese Reaktion des Kaliums ist bereits von Schoorl (Ztschr. analyt. Chem., **48**, 606 [1909]) beschrieben worden.

Kleine mikrochemische Beiträge. X[1].

Von

L. Rosenthaler.

Bern.

(Eingelangt am 26. Oktober 1933.)

Über die Formen der Erdalkali-Sulfatfällungen.

Die Sicherheit, mit der Stoffe durch die Behrens'schen Kristallfällungen nachgewiesen werden können, ist weitgehend davon abhängig, inwieweit sie durch Beimengungen beeinflußt werden. Ein solcher Einfluß kann sich nach mehreren Richtungen erstrecken. Im ungünstigsten Fall kommt die Fällung überhaupt nicht zustande, es kann aber auch nur die Empfindlichkeit abgeändert werden, sei es, daß sie erhöht oder, wie wohl in der Mehrzahl der Fälle, herabgesetzt wird; schließlich können aber, wie seit langem bekannt, auch die Kristallformen verändert werden. Gelegentliche Beobachtungen veranlaßten mich zu untersuchen, welche Formen die Erdalkali-Sulfat-Fällungen unter verschiedenen Bedingungen zu bilden vermögen. Sämtliche Versuche wurden so angestellt, daß festes Sulfat zu der 2,5%igen Lösung des Erdalkalisalzes gebracht wurde.

[1] Vorhergehende X. Mitteilung. Mikrochemie, **XIII**, 317 (1933). In dieser Abhandlung sind folgende Druckfehlerberichtigungen vorzunehmen:

S. 317, 8. Z. v. o.: statt Benzin: Bruzin,
18. Z. v. o.: „ den: dem,
20. Z. v. o.: „ Schnecken: Scheeren.
S. 318, 2. Z. v. u.: „ Mißerfolg: Mikroskop,
S. 319, 12. Z. v. o.: „ bestehenden: bestehende,
6. Z. v. u.: „ CNP′: CNS′,
4. Z. v. u.: „ Melitzky: Malitzky,
2. Z. v. u.: „ 1931: 1921.

Baryumsulfat.

Nach Behrens-Kley[2] fällt Baryumsulfat aus mit Schwefelsäure oder Sulfaten versetzten Lösungen als äußerst feines, nicht erkennbares Pulver aus. Ich fand bei Versuchen mit dem Azetat, Chlorid und Nitrat des Baryums einerseits, dem Kaliumsulfat, Kaliumbisulfat, Natriumsulfat, Magnesiumsulfat und Ammonsulfat anderseits neben den amorphen Gebilden in allen Fällen geformte, meist Stäbe und Spieße, oft in kleineren oder größeren Aggregaten (Sterne, Büschel und dergleichen). Die geformten Gebilde überwiegen meist (Ausnahme Baryumnitrat) die amorphen. Zusätze von Natriumchlorid, Kaliumbromid und Kaliumjodid bewirken, daß die Niederschläge fast nur noch amorph sind. Ausnahmen wurden beobachtet bei Baryumchlorid, Kaliumbromid, Magnesiumsulfat und Baryumnitrat, Natriumchlorid und Kaliumsulfat.

Strontiumsulfat.

Für Strontiumsulfat gibt Behrens-Kley[3] nur an, daß man es mit verdünnter Schwefelsäure als feinkörnigen Niederschlag erhält. Über die Fällung mit Sulfaten findet sich daselbst keine Angabe. Bei Versuchen mit dem Nitrat, Laktat und Bromid des Strontiums einerseits, den obenerwähnten Sulfaten anderseits, fand ich, daß neben den amorphen Teilchen in allen Fällen Nadelbüschel auftraten, die die Neigung zeigen, wieder zu verschwinden. Beim Zusatz der auch in den Versuchen mit Baryum benützten Halogensalze zeigte es sich, daß Bromid und Jodid sphärokristallinische Gebilde erzeugten, während Natriumchlorid die Bildung amorpher Niederschläge begünstigte.

Kalziumsulfat.

Kalziumsulfat ist, wie bekannt, leicht kristallinisch zu erhalten. Seine verschiedenen Formen sind in Behrens-Kley[4] abgebildet. Unter meinen Beobachtungen sind folgende bemerkenswert: Ammonsulfat bildet mit Kalziumazetat, aber nicht mit dem Nitrat, Chlorid, Bromid oder Chlorat vorwiegend viereckige Täfelchen mit

[2] Mikrochem. Analyse, 4. Aufl., 1. T., S. 58.
[3] l. c., S. 54.
[4] l. c., S. 50.

schiefen Endflächen. Kaliumbisulfat bildet mit den genannten Kalziumsalzen außer spießigen Kristallen mehreckige Platten und ovale Gebilde. Natriumsulfat erzeugt vorwiegend kleine Prismen mit eingekerbten Enden. Aus Magnesiumsulfat und dem Azetat bilden sich vorwiegend viereckige Plättchen mit schiefen Endflächen, seltener solche mit eingekerbten Enden. Die Halogenverbindungen üben meist keinen großen Einfluß aus. Doch verhindert Natriumchlorid bei dem Azetat, Nitrat und Chlorat des Kalziums die mit Kaliumbisulfat entstehenden anormalen Gebilde; statt ihrer entstehen Formen, wie sie aus den Kalziumsalzen mit Natriumsulfat entstehen. Bei Gegenwart von Bromid oder Jodid bilden die Kalziumsalze mit Natriumsulfat nur die normalen Gipskristalle.

Über die chemische Zusammensetzung der beobachteten Fällungen müßte eine eingehendere Untersuchung Aufschluß geben. Prinzipiell sei nur bemerkt, daß die anormalen Formen von den normalen chemisch verschieden sein können und es in den meisten Fällen wohl auch sind.

Über einen Versuch, ein neues Prinzip in der organischen Mikro-Elementaranalyse zu verwenden.

Von

Karl Schwarz.

Aus dem I. Chem. Universitätslaboratorium Wien.

(Eingelangt am 21. November 1933.)

Die organische Mikro-Elementaranalyse, die von Pregl eingeführt und in der Folgezeit in manchen Punkten verbessert wurde, ist insofern zu einem gewissen Abschluß in ihrer Entwicklung gekommen, als sie schon nahe an der Grenze dessen angelangt zu sein scheint, was eben bei äußerster Verfeinerung der Methode zu erhoffen ist. Eine Anwendbarkeit auf Substanzmengen, die wesentlich kleiner als etwa 1 mg sind, ist kaum zu erhoffen. Wenn man bedenkt, welche Fülle von Untersuchungen die Einführung der Mikroanalyse, die nur wenige Milligramm Substanz erforderte, ermöglicht hat, so scheint eine weitere weitgehende Verfeinerung durchaus nicht zwecklos und überflüssig.

Auf jeden Fall wird man dabei die rein gewichtsanalytischen Methoden verlassen und prinzipiell neue Wege suchen müssen. Ansätze dazu sind schon vorhanden, es sei nur an die maßanalytische Bestimmung von CO_2 und H_2O erinnert[1]. Einen weiteren kleinen Beitrag in dieser Richtung soll diese Arbeit liefern.

Es sei gleich bemerkt, daß die hier wiedergegebenen Untersuchungen noch zu keiner ausgearbeiteten Methode geführt haben. Nun kann aus äußeren Gründen die Arbeit augenblicklich nicht

[1] Siehe Josef Lindner: Verfahren zur maßanalytischen Bestimmung des Kohlenstoffes und Wasserstoffes in der Elementaranalyse. Ztschr. analyt. Chem., **66**, 305 (1925). Ber. D. ch. G., **55**, 2025 (1922). Monatsh. Chem., **53/54**, 271 (1929).

fortgesetzt werden; die bisherigen Ergebnisse lassen aber immerhin die Erwartung bestehen, daß sich in der Hand geschickter Experimentatoren eine brauchbare Methode herausbilden werde, die dadurch, daß sie prinzipiell auf beliebig kleine Substanzmengen ausgedehnt werden kann, eine wünschenswerte Bereicherung der mikroelementaranalytischen Methoden bedeuten würde.

Bei der Verbrennung einer einfachen organischen Substanz mit einer gemessenen Menge Sauerstoff im Überschuß liegen sehr einfache Verhältnisse vor. Im allgemeinen wird man dabei das Volumen der verbrannten Substanz vernachlässigen können. Dann ergibt sich:

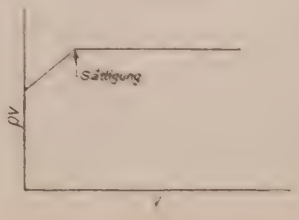
$C + O_2 = CO_2$ keine Volumänderung
$H + \frac{1}{4} O_2 = \frac{1}{2} H_2O$ Volumzunahme $\frac{1}{4}$ Mol
$O = \frac{1}{2} O_2$ Volumzunahme $\frac{1}{2}$ Mol
$N = \frac{1}{2} N_2$ Volumzunahme $\frac{1}{2}$ Mol.

Die Verbrennungsgase haben eine sehr einfache Zusammensetzung, sie bestehen aus:

O_2, H_2O, CO_2 und eventuell N_2 (bei stickstoffhältigen Substanzen).

Wenn es gelingt, H_2O und CO_2 zu bestimmen, so kann aus der Volumsänderung bei der Verbrennung auch der Sauerstoff ermittelt werden, so daß man prinzipiell die Möglichkeit hätte, Substanzmengen, die nicht mehr gewogen werden können, doch noch zu analysieren. Stickstoff würde mit dem Sauerstoff zusammen bestimmt werden und könnte bei anderweitiger Bestimmung leicht in Rechnung gesetzt werden.

Die erste Untersuchung beschäftigte sich mit einer Bestimmung des Wassers in den Verbrennungsgasen. Der Grundgedanke ist folgender: Wird ein Gemisch von Sauerstoff, Kohlensäure, Stickstoff und Wasserdampf isotherm komprimiert, so ergibt sich eine p-v-Beziehung, die in Diagramm I skizziert ist.



Bei kleinen Drucken (großem Volumen) ist pv = konstant; bei zunehmender Verringerung des Volumens wird ein Punkt erreicht, wo der Partialdruck des Wasserdampfes den Wert des gesättigten Dampfes erreicht. Bei weiterer Kompression muß sich jetzt Wasser kondensieren. Dadurch scheidet ein Bestandteil aus dem Gas aus, so daß das p . v-Produkt von dieser Stelle an abnehmen muß. In der Kurve zeigt sich an der Stelle beginnender Sättigung ein Knick. Der Gesamtverlauf der Kurve pv als abhängig von v ist in Diagramm I dargestellt. Ist nun Volumen und Temperatur der Sättigung bekannt, so kann man den Partialdruck des Wasserdampfes aus irgendeiner Tabelle entnehmen und nach der Formel:

$$v_o = \frac{v \cdot p_w}{p_o\,(1+\alpha t)}, \qquad g_w = \frac{v_o}{22400}\,18{,}016$$

v = Volumen beginnender Sättigung.
p_w = Sättigungsdruck des Wassers in mm Hg.
p_o = 760.
$\alpha = \frac{1}{273}$.
t = Celsius-Temperatur.
g_w = Gewicht des Wassers in g.

das Gewicht des Wassers berechnen.

Die Untersuchung ging nun zunächst dahin, ob sich tatsächlich ein derartiges Diagramm experimentell mit hinreichender Schärfe und Genauigkeit und mit einem Knick an der richtigen Stelle erzielen ließ. Das Verfahren schon jetzt auf extrem kleine Substanzmengen auszuarbeiten, schien fürs erste nicht zweckmäßig, stand doch für die Einwaagen auch bloß eine Mikrowaage zur Verfügung, mit der sich bestenfalls eine Wägegenauigkeit von 2,10 $^{-6}$ erzielen ließ.

Beschreibung der verwendeten Apparatur.

Der wichtigste Teil der Apparatur, die in den Fig. 1 bis 3 dargestellt ist, ist das Verbrennungsgefäß mit angeschmolzener Gasbürette. Das eiförmige Verbrennungsgefäß war starkwandig und hatte ein Volumen von nicht ganz 4 cm^3. In einem seitlichen Schliff saß ein Glasstopfen, durch den zwei starke Platindrähte durchgeschmolzen waren (siehe Fig. 2). Die Drähte trugen eine aus

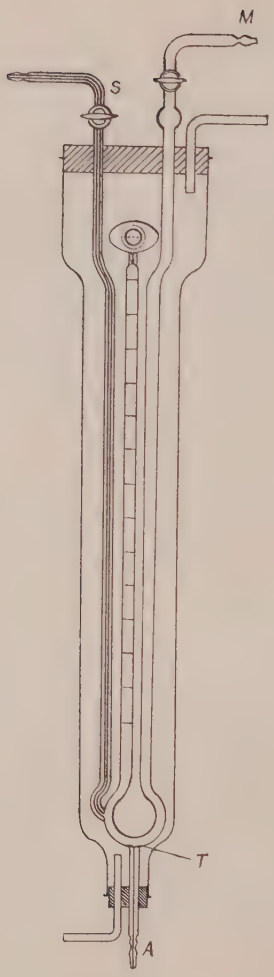


Fig. 1.

Fig. 3.

0,25 mm starkem Platindraht verfertigte Spirale, in die das Schiffchen zur Verbrennung gestellt werden konnte.

Das Verbrennungsgefäß war mittels einer Kapillare mit der Gasbürette verbunden (Fig. 1 und 2). Letztere war bei einer Länge von 72 cm in $^1/_{50}$ cm³ geteilt und zeigte von 4 bis 17 cm³. In die 4 cm³ war das Verbrennungsgefäß mitgerechnet. Knapp rechts neben der

Bürette (Fig. 1) lief ein Rohr mit genau demselben Durchmesser, das zur Druckmessung diente. Das dritte Rohr (in Fig. 1, links) diente zum Füllen des Apparats mit Sauerstoff. Dieser ganze Teil

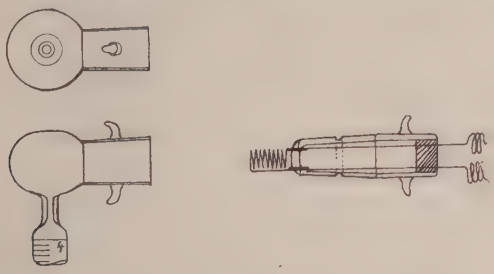


Fig. 2.

des Apparats konnte in einen Dampfmantel gesteckt werden, in dem er durch Durchleiten von Azetondampf auf recht konstante Temperatur gebracht werden konnte.

Der Hahn M führte zum Manometer. Durch Hahn S konnte trockener Sauerstoff eingeleitet werden. Der untere Ansatz A war über einen Hahn mittels Druckschlauch mit einer Quecksilberbirne verbunden. Als Manometer diente ein verlängertes Quecksilberbarometer.

Arbeitsweise.

In das frisch ausgeglühte Quarzschiffchen wurde die Substanz auf etwa 0,003 mg genau eingewogen. Hierauf wurde die Platinspirale frisch ausgeglüht und nach dem Erkalten das Schiffchen mit der Substanz eingeschoben. Im Apparat wurde inzwischen das Quecksilber bis knapp ober den Rohransatz T gesenkt und sorgfältig gereinigter und getrockneter Sauerstoff von S aus durch den Apparat geleitet. Nach 10 Minuten langem Durchspülen wurde der die Platinspirale mit dem Schiffchen tragende Schliffstopfen eingesetzt, so daß der noch nicht abgestellte Sauerstoffstrom jetzt bei T durch das Quecksilber perlte und bei M entweichen konnte. Nach Abstellen des Sauerstoffstromes wurde die Quecksilberbirne gehoben und durch kurzes Lüften des Schliffes so viel Sauerstoff ausströmen gelassen, daß etwa 11 cm^3 Sauerstoff im Apparat verblieben. Jetzt wurde der Schliff, der immer frisch mit einem besonders zähen Hahnfett geschmiert war, mit einer Feder fest

niedergedrückt und der Apparat ganz in den Dampfmantel versenkt und dieser oben durch einen Kork verschlossen. Am Kork war ein in Zehntelgraden geteiltes Thermometer aufgehängt. Nun wurde Azetondampf von oben nach unten durch den Mantel durchgeleitet, wodurch der Apparat in kurzer Zeit auf konstante Temperatur gebracht wurde. Durch passendes Verschieben des Quecksilberniveaugefäßes wurde in Bürette und im rechtsliegenden Rohr das Quecksilber auf genau gleiche Höhe gebracht und das Volumen abgelesen und notiert.

Jetzt wurde Hahn M und S geschlossen und der Sauerstoff durch Heben des Quecksilberniveaugefäßes ganz in das Verbrennungsgefäß gepreßt. Durch Einschalten des Stromes (etwa 8 Volt und 6 bis 7 Ampere) wurde die Platinspirale in helle Rotglut gebracht und man konnte die lebhafte Verbrennung der Substanz beobachten. Die Verbrennung dauerte etwa 1 bis 2 Sekunden. Bisweilen bildete sich zuerst am Schiffchen etwas Ruß, der aber nach wenigen Sekunden Glühens vollständig verschwand.

Zur Vermeidung einer bei der Abkühlung unvermeidlichen Kondensation des Wassers wurde sofort nach Ausschalten des Stromes das Niveaugefäß gesenkt und die noch heißen Verbrennungsgase auf Unterdruck gebracht. Nach etwa zehn Minuten war Temperaturgleichheit erreicht und es wurde mit der Aufnahme des v p-Diagramms begonnen.

Zunächst wurde wieder das Volumen bei Atmosphärendruck gemessen. Aus der Volumsänderung sollte dann auf den Sauerstoffgehalt geschlossen werden. Hierauf wurde der bis jetzt freie und offene Hahn U über ein gut regulierbares Ventil mit einer Stickstoffbombe verbunden und ein kleiner Überdruck eingelassen und der Hahn U wieder geschlossen. Durch Heben der Quecksilberbirne wurde in Bürette und Manometerteil auf genau gleichen Druck eingestellt, so daß das Quecksilber in den beiden Schenkeln der Apparatur gleich hoch stand. Hierauf wurde Volumen und Druck notiert, wieder der Druck erhöht usw., bis eben das genaue Diagramm aufgenommen war.

Das Volumen konnte dabei mit einer Genauigkeit von etwa 0,005 cm^3 und der Druck mit einer Genauigkeit von 0,5 mm Quecksilber gemessen werden. Die Temperatur war auf $^1/_{100}$ Grad konstant und auf etwa 0,1° definiert.

Aus den abgelesenen Werten von Druck und Volumen wurde das Produkt pv berechnet und gegen das Volumen auf Millimeterpapier in geeignetem Maßstab aufgetragen. Aus dem auftretenden Knick wurde das Sättigungsvolumen entnommen und aus diesem und dem nach der Temperatur ermittelten Sättigungsdruck des Wassers die Menge des Wassers errechnet.

Im folgenden sind einige Kurven wiedergegeben, die auf diese Weise erhalten wurden. Ein einzelner Versuch ist zum besseren Verständnis vorher besonders ausführlich wiedergegeben.

Einwaage: 1,440 mg Rohrzucker.

Barometerstand b: 765 mm.

Volum Sauerstoff vor Verbrennung: 11,210 cm³.

Temperatur: 56,31°.

Nach der Verbrennung wurde das v-pv-Diagramm ermittelt, die Werte sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

v	p	pv
12,366	765	9460
11,032	858,7	9475
10,180	930,3	9472
9,590	988,0	9475
9,070	1046,0	9487
8,325	1139,5	9485
7,808	1213	9474
7,116	1325	9430
6,678	1407	9388
6,185	1515	9370
5,740	1629	9350
5,402	1727	9330
4,960	1873	9300
4,621	2005	9270
4,350	2127	9253
4,195	2204	9246

Nach bekannten Tabellen[2] findet man für eine Temperatur von 56,3° einen Dampfdruck des Wassers von 126 mm Hg. Die Kurve, die in Fig. 4 als Kurve I dargestellt ist, zeigt einen scharfen Knick bei einem Volumen von 7,85 cm³. Daraus berechnen sich 0,867 mg Wasser oder 0,0965 mg Wasserstoff.

[2] Z. B. Landolt-Börnstein, Physikalisch-Chemische Tabellen, 5. Aufl., S. 1317.

Das ergibt einen Prozentgehalt von 6,7% Wasserstoff gegen den berechneten Wert: 6,43.

In Verbindung mit der Volumzunahme errechnet sich ein Wert für Sauerstoff 42,0% gef., ber. 51,3%.

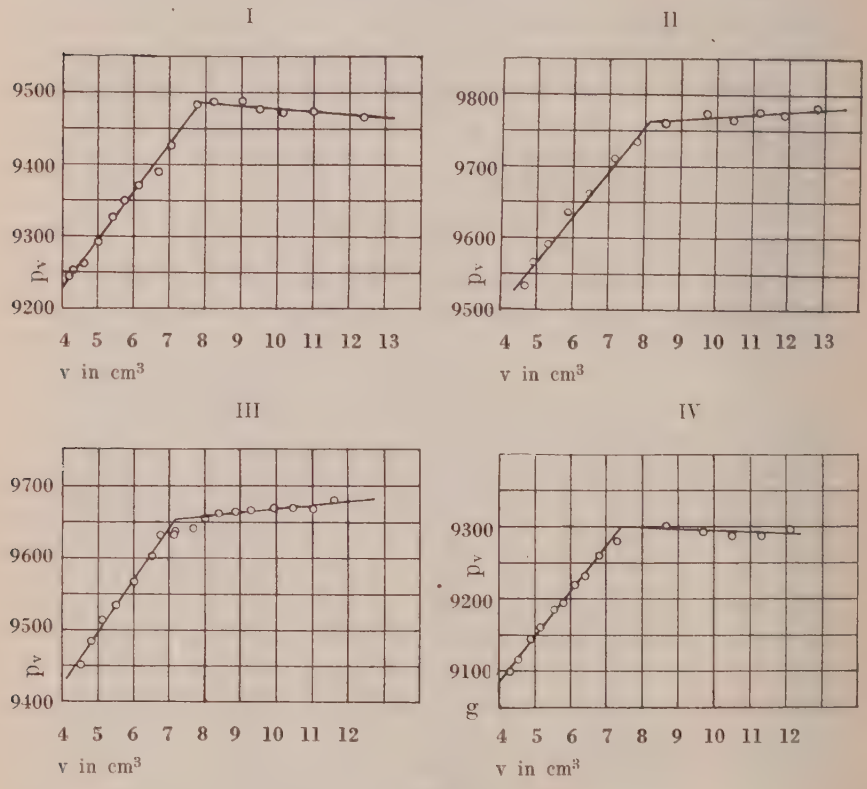


Fig. 4.

Die Ergebnisse anderer Versuche sind im folgenden zusammengestellt:

Einwaage Rohrzucker: 1,53 mg
gef.: 6,54% H, gef.: 41,4% O
ber.: 6,43% H, ber.: 51,3% O.
Einwaage Rohrzucker: 1,587 mg
gef.: 6,2% H, gef.: 45,0% O.

Einwaage Benzil: 1,733 mg
gef.: 5,2% H, gef. 11,5% O
ber.: 4,8% H, ber.: 15,2% O.
Einwaage Benzil: 1,800 mg
gef.: 5,1% H, gef.: 8% O.

Eine Probe p-Toluidin ist sehr unvollständig verbrannt, so daß das Verbrennungsgefäß nachher deutlich eine Gelbfärbung zeigte, dementsprechend ist der Wasserstoffwert zu niedrig ausgefallen.

Einwaage: 1,014 mg H, gef.: 7,5%, ber.: 8,4%.

Wie man erkennt, sind die Werte für den Wasserstoff ungefähr von derselben Genauigkeit, die sich bei der üblichen Mikroanalyse erzielen läßt. Es ist jedenfalls zu erwarten, daß die Genauigkeit leicht zu verbessern sein wird, da man ja nie bei den ersten Versuchen das Letzte aus einer neuen Methode herausholen wird.

Etwas unangenehmer steht es mit dem ganz beträchtlichen Defizit an Sauerstoff. Die Ursache ließ sich bis jetzt nicht auffinden. Zuerst wurde angenommen, daß der Sauerstoff nicht genügend rein sei. Es zeigte sich jedoch im Blindversuch, daß nach Komprimieren, Glühen des leeren Schiffchens, Abkühlenlassen und Wiedereinstellen auf Atmosphärendruck das Volumen des Sauerstoffs stets unverändert blieb. Auch die Hypothese, daß Spuren des Kohlendioxyds vom Hahnfett aufgenommen würden, erwies sich als unhaltbar. Bei einer unvollständigen Verbrennung, etwa zu Kohlenmonoxyd oder Kohle, könnte auch keine Volumsabnahme auftreten. Eine Adsorption von Wasser scheint wieder deshalb unwahrscheinlich, weil dann der Wert für den Wasserstoff hätte schlechter ausfallen müssen.

Die Ursache des Sauerstoffdefizits bleibt also ungeklärt.

Zusammenfassend kann man sagen, daß sich der versuchte Weg als prinzipiell gangbar erwiesen hat, daß aber noch Verbesserungen notwendig sind. Weitere Versuche hätten in erster Linie die Verbrennung so zu verbessern, daß auch leicht flüchtige und schwer verbrennbare Substanzen einwandfrei und vollständig verbrannt werden können. Die Ursache des Sauerstoffschwundes müßte aufgeklärt und behoben werden. Schließlich müßte die Apparatur noch ganz wesentlich verkleinert werden, da ja nur die Möglichkeit, wesentlich kleinere Mengen als etwa ein Milligramm analysieren zu können, einen die Mühe lohnenden Fortschritt bedeuten würde.

Die Bestimmung kleinster Kupfermengen durch Messung ihrer katalytischen Wirkung.

Von

Friedrich L. Hahn.

Paris, Laboratoire de Chimie Générale, Sorbonne.

(Eingelangt am 21. Oktober 1933.)

F. Pavelka und Hermine Morth haben kürzlich zur Bestimmung kleinster Kupfermengen eine Reaktion verwendet[1], die von mir und G. Leimbach zur Erkennung von Kupferspuren empfohlen worden ist[2], nämlich die katalytische Beschleunigung der Reaktion zwischen Eisen(III)-Rhodanid und Thiosulfat, erkennbar an der Entfärbung der tiefroten Lösung. In der Zwischenzeit hatte auf meine Veranlassung W. Voelkel gleichfalls die Möglichkeit einer quantitativen Auswertung dieser Reaktion untersucht und hierbei gefunden[3]:

1. Die Geschwindigkeit der Entfärbung hängt in hohem Maße von Nebenumständen ab (wie dies zu erwarten war und auch von Pavelka und Morth gefunden wurde). Lösungen, die aus gleichen Mengen von Eisenalaun, Ammoniumrhodanid und Salzsäure bereitet und mit den gleichen Mengen Thiosulfat versetzt wurden, zeigten nicht stets die gleichen Entfärbungszeiten[4].

[1] Mikrochemie, XIII, 305 (1933).

[2] B., 55, 3070 (1922); die von Pavelka und Morth erwähnte weitere Arbeit, B., 57, 671 (1924) steht hiermit nicht in Zusammenhang.

[3] Dissertation, Frankfurt a. M. (1924), kurz erwähnt bei Fr. L. Hahn, Festschrift des Physikalischen Vereines, Frankfurt a. M. (1924).

[4] Eine merkliche Änderung entstand z. B. schon dann, wenn einmal Eisenalaun in Wasser gelöst und darauf Salzsäure zugefügt, ein andermal aber das Eisensalz in dem vorher bereiteten Gemisch von Wasser und Salzsäure gelöst wurde. Ob die anscheinend etwas günstigeren Ergebnisse von Pavelka und Morth auf der Verwendung fertigen Eisenrhodanids beruhen oder etwa darauf, daß zu allen Versuchen ein und dieselbe Lösung diente, geht aus ihrer Mitteilung leider nicht hervor.

Es schien daher unmöglich, ein für allemal anzugeben: Ein in der und der Weise bereitetes Reagensgemisch hat ohne Cu die Entfärbungszeit t_0, mit a γ Cu die Entfärbungszeit t_a, mit b γ die Zeit t_b usw., vielmehr müßte man für neu angesetzte Lösungen stets wieder neue Eichkurven: Entfärbungszeit / Kupfergehalt aufnehmen.

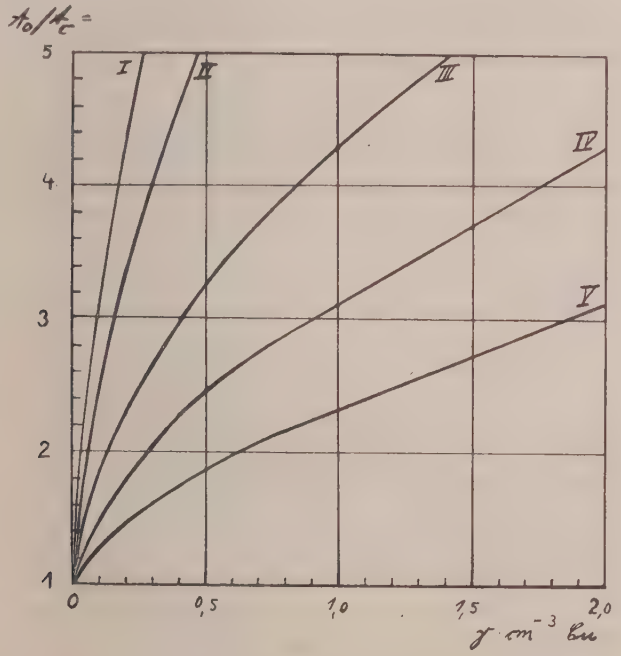


Fig. 1.

Quotient aus Entfärbungszeit in kupferfreier Lösung t_0, dividiert durch Entfärbungszeit in kupferhaltiger Lösung t_c als Funktion der Kupferkonzentration c.

Zusammensetzung der Reagenslösungen:

Kurve	100 cm³ Reaktionsgemisch enthalten:				t_0 (bei 0°)
	mmol $Fe^{\cdots}$	CNC′	HCl	S_2O_3''	ungefähr Min.
I	0,5	5	5	1,5	122
II	1	5	5	3	50½
III	1	10	10	3	56
IV	1	20	20	3	53½
V	1	30	30	3	52

2. Wesentlich unempfindlicher gegen kleine Schwankungen von Temperatur, Säuregrad, Konzentration an reagierenden oder beigemischten Stoffen ist der Quotient aus der Entfärbungszeit der kupferfreien gegen die kupferhaltige Lösung. Für diesen Quotienten t_0/t_c in seiner Abhängigkeit von der zu ermittelnden Kupferkonzentration c lassen sich daher Eichkurven ein für allemal derartig festlegen, daß sie auch dann gültig bleiben, wenn die verwendeten Reagenslösungen durch neue ersetzt werden. Für ein einfaches und zuverlässiges Verfahren zur Bestimmung kleinster Kupfermengen ergibt sich demnach folgende Vorschrift:

Nach Fig. 1 sucht man eine Zusammenstellung der Reagenslösungen aus, die dem zu erwartenden Kupfergehalt und der verlangten Genauigkeit entspricht. (Bei völlig unbekanntem Kupfergehalt Vorversuch mit Lösung V, die in einem weiten Konzentrationsbereich mit hinreichender Genauigkeit zu messen gestattet.) Mit diesen Lösungen setzt man unter sonst gleichen Bedingungen Leerversuch und Messung an, die t_0 und t_c liefern; der Quotient gibt aus der Eichkurve den Kupfergehalt. Wir haben es vorteilhaft gefunden, als „Entfärbungszeit" nicht die Zeit bis zum völligen Farbloswerden der Lösungen anzusehen, sondern das Erreichen der Farbgleichheit mit einer sehr schwachen Eisenrhodanidlösung[1]; das ist eine Einzelheit ohne grundsätzliche Bedeutung. Daß sich im Bedarfsfall eine weitgehende Steigerung der Genauigkeit müßte erreichen lassen, wenn man das zeitliche Fortschreiten der Entfärbung mit einer photoelektrischen Zelle verfolgt, ist als sicher anzunehmen.

[1] Der gleiche Gehalt Rhodanion wie in der Reaktionslösung und ein Tausendstel des angewandten Eisens.

Bemerkungen zur quantitativen Mikro-Mineralanalyse[1].

Von

Friedrich Hecht.

Aus dem Analytischen Laboratorium der Universität Wien.

In einer in dieser Zeitschrift[2] erschienenen Abhandlung von H. Thurnwald und A. A. Benedetti-Pichler, betitelt „Gravimetric Microanalysis of Beryllium Silicate Rocks", finden sich einige Bemerkungen, welche mich zu einer sachlichen Richtigstellung veranlassen. Die betreffenden Stellen lauten: "I would like to point out, that this paper gives for the first time a well founded procedure for a very complicated quantitative separation which can be started with only a few milligrams of sample." (Seite 201) sowie ferner: "A complete procedure for a complicated quantitative micro analysis in which a single sample of a few milligrams weight was used, has been carried out for the first time." (Seite 220.) Demgegenüber sei bemerkt, daß in Band **X**, Seite 45, dieser Zeitschrift eine Arbeit von mir unter dem Titel „Zur Analyse sehr kleiner Mengen von Morogoro-Uraniniten" erschienen ist, welche auf Seite 51 folgenden Satz enthält: „In diesem Zusammenhange möge darauf hingewiesen sein, daß, soweit mir bekannt ist, im vorliegenden Falle zum ersten Male eine Mikromethode für den Analysengang eines Minerals praktisch durchgearbeitet und zahlenmäßig belegt wurde."

Die beiden oben genannten Autoren sind der Ansicht, die ersten zu sein, welche komplizierte, quantitative mikroanalytische Trennungen in einem Analysengange an einer Einwaage vorgenommen haben. Denselben Anspruch, und zwar ebenfalls für eine Mikromineralanalyse, habe ich aber schon mehr als ein halbes Jahr früher auf Grund der oben zitierten Arbeit (Einreichungs-

[1] Infolge eines Versehens ist die Auseinandersetzung zwischen den Herren Fr. Hecht in Wien und A. A. Benedetti-Pichler, N. Y., in Heft **XIV**, 1 nur teilweise zum Abdruck gelangt. Um den logischen Zusammenhang der Polemik zu wahren, werden auch die beiden bereits veröffentlichten Artikel nochmals zum Abdruck gebracht. Die Redaktion.

[2] Mikrochemie, **XI**, 200 (1932) (der Schriftleitung eingereicht am 22. Februar 1932).

datum 17. Juli 1931) erhoben. Meine Arbeit, über deren Fortgang ich gemeinsam mit W. Reich-Rohrwig in der Wiener Chemisch-Physikalischen Gesellschaft berichtet habe[3], dürfte daher offenbar H. Thurnwald und A. A. Benedetti-Pichler entgangen sein. Im übrigen hat am 15. Februar 1932 Herr Dr. H. Hufber vor der Wiener Mineralogischen Gesellschaft einen Vortrag über Gesamtmikroanalysen von titan- und mangan-haltigen Silikaten gehalten[4]. Allenfalls wäre noch eine von A. v. Endredy am 25. Februar 1932 eingereichte Arbeit über die Halbmikroanalyse sulfidischer Mineralien[5] zu erwähnen.

H. Thurnwald und A. A. Benedetti-Pichler haben ihre Methode an gestellten Lösungen überprüft, während ich meine Analysen mit Hilfe von nach bewährten Methoden[6] ausgeführten Makroanalysen an homogenem Material kontrolliert und gute Übereinstimmung gefunden habe. Es wurde dabei dieselbe Genauigkeit erreicht, welche W. F. Hillebrand, der Altmeister und Begründer der wissenschaftlich exakten Analyse der Pechblenden, bei diesen Analysen erzielt hat[7], und demgemäß kann an der Anwendbarkeit mikroanalytischer Methoden für die besonderen Zwecke der Mineralanalyse nicht gezweifelt werden.

Ein Unterschied in der von H. Thurnwald und A. A. Benedetti-Pichler einerseits und mir anderseits befolgten Arbeitsweise besteht darin, daß erstere mit Einwaagen von 2 bis 4 mg Mineral, ich jedoch mit solchen von 20 bis 30 mg gearbeitet habe. Es ist jedoch in Betracht zu ziehen, daß die von mir analysierten Morogoro-Pechblenden allein zu 83 bis 86% aus U_3O_8 und zu rund 7% aus PbO bestanden, während die übrigen Bestandteile bloß von 0,03 bis 2,76% betrugen; angesichts einer derart ungünstigen Zusammensetzung, bei der beinahe neun Zehntel des Minerals auf U_3O_8 allein entfallen, war es naturgemäß erforderlich, mit der Einwaage etwa um eine 10er-Potenz gegenüber derjenigen Menge hinaufzugehen, mit der andernfalls das Auslangen zu finden ge-

[3] Vortrag am 26. Jänner 1932; referiert in Ind. Eng. Chem. News Ed., vol. 10 p. 87, mit Datum vom 3. Februar 1932, sowie auch in Allg. österr. Chem. Techn. Ztg., **50**, 35 (1932).

[4] Inhaltlich wiedergegeben in Mineral. petrogr. Mitt., **43**, 84 (1932).

[5] Ztschr. analyt. Chem., **89**, 100 (1932).

[6] E. Körner und F. Hecht, Monatsh. Chem., **49**, 498 (1928).

[7] Bull. geol. Surv. U. S., Nr. **78** (1891).

wesen wäre. In der Tat hielten sich die Mikroauswaagen aller Bestandteile der Morogoro-Pechblenden, mit Ausnahme des Urans, vollkommen in der gleichen Größenordnung wie bei den Beryllgesteinsanalysen von H. THURNWALD und A. A. BENEDETTI-PICHLER. Dabei ist noch zu bedenken, daß das besonders hohe Atomgewicht von Uran und Blei an und für sich ein bedeutend größeres spezifisches Gewicht und daher relativ kleineres Volumen ihrer Bestimmungsformen, mithin eine gesteigerte Schwierigkeit des Operierens mit ihnen zur Folge hat.

Daß die in meiner ersten Mitteilung dargelegten Analysenmethoden sich weiterhin bewährt haben und inzwischen weiter ausgebaut werden konnten, ist aus Veröffentlichungen[8] ersichtlich, die zum Teil gemeinsam mit W. REICH-ROHRWIG für das amerikanische „Committee on the measurement of geologic time" ausgeführte Arbeiten betreffen. Seit längerer Zeit arbeiten wir außerdem an ihrer Überprüfung mittels Standardlösungen und hoffen, bald in der Lage zu sein, die Ergebnisse in dieser Zeitschrift zu publizieren. Wien, im November 1932.

BEMERKUNGEN ZUR QUANTITATIVEN MIKRO-MINERALANALYSE.

By

A. A. BENEDETTI-PICHLER.

The paper on "Gravimetric Microanalysis of Beryllium Silicate Rocks" by HILDE THURNWALD and BENEDETTI-PICHLER[1] was received in Vienna by the editor on February 22, 1932. Therefore it must have been mailed in New York at least on or before February 15th. From these facts it is obvious that the lecture of H. HUEBER (Vienna, February 15th) and the paper of A. v. ENDRÉDY (received February 25th) have no bearing on the discussion in so far as the priority of our paper is concerned.

In referring to this paper of THURNWALD and BENEDETTI-PICHLER on gravimetric microanalysis, FR. HECHT says: "The two above named authors think to be the first who have carried out complicated quantitative micro analytical separations in one

[8] Mikrochemie, **XII**, 193 (1932); 281 (1933).

[1] H. THURNWALD and A. A. BENEDETTI-PICHLER, Mikrochemie, **XI**, 200 (1932).

sample." This we did not claim in 1932 since one of us[2] before 1926 had already carried out micro analyses of antique bronzes which involved the separation and gravimetric determination of 5 constituents (Sn, Sb, Cu, Pb and Ni) in each sample.

When in 1931 Fr. Hecht in his preliminary paper[3] stated that he is the first to apply micro methods to the complete analysis of m i n e r a l s, I did not see any reason for objecting. Because of his claim, I used the following formulation in the introduction of our paper: " . . . this paper gives for the first time a well founded procedure for a very complicated quantitative separation which can be started with only a few milligrams of sample. Every single step has been tested separately and in combination with all of the previous operations which might influence it, so that practically nothing was left to chance or to assumption." The sentence in the summary, „A complete procedure . . . has been carried out for the first time", is only a repetition of the same statement in a more brief form.

I am certain that Fr. Hecht cannot raise any just objection to our claim of being the first to formulate a complete procedure since even now he says in the last paragraph of his "Bemerkungen" with respect to the methods published in his preliminary paper of July 1931: "For already some time we are also working on their control by means of standard solutions and we hope soon to be able to present the results." Our paper is the last of a series and presents a complete, thoroughly tested procedure.

New York, December 1932.

Bemerkungen zur quantitativen Mikro-Mineralanalyse.

Von

Friedrich Hecht.

(Entgegnung auf die vorstehende Erwiderung von A. A. Benedetti-Pichler.)

Die vorstehende Entgegnung von A. A. Benedetti-Pichler gibt mir Gelegenheit, meinen Standpunkt nochmals genau zu präzisieren, um etwa mögliche Mißverständnisse auszuschließen.

[2] F. Emich, Lehrbuch der Mikrochemie, p. 158 (München 1926). See also footnote 2 in Mikrochemie, **XI**, 201 (1932).

[3] Fr. Hecht, Mikrochemie, **X**, 45 (1931).

Die Priorität der von A. A. Benedetti-Pichler seinerzeit ausgeführten Bronzeanalysen möchte ich keineswegs bestreiten, zumal ich sie auch in dem in meinen Bemerkungen zitierten Vortrag[1] entsprechend erwähnt habe. Ich erhebe nur den Anspruch, als erster einen Gang für eine Mineral-Mikroanalyse mit Erfolg ausgearbeitet, durchgeführt und durch Makroanalysen kontrolliert zu haben. Eben deshalb glaube ich, die Ansprüche von H. Thurnwald und A. A. Benedetti-Pichler als teilweise mit meinen zusammenfallend ansehen zu dürfen, zumal es sich auch hier um eine Mineralanalyse handelte. Ich hätte keinen Einwand gemacht, wenn dort von einer erstmaligen Kontrolle mit Hilfe von Standardlösungen und -substanzen die Rede gewesen wäre. Eine Erwähnung meiner Arbeit an jener Stelle wäre vielleicht zweckmäßig gewesen, da sonst ein mit der einschlägigen Literatur nicht völlig vertrauter Leser möglicherweise zur Ansicht gelangen könnte, daß vor H. Thurnwald und A. A. Benedetti-Pichler niemand anderer Gesamtanalysen von Mineralen auf dem Wege der Mikroanalyse mit Erfolg durchgeführt hat.

Die Arbeiten von H. Hueber und von A. v. Endrédy waren von mir nicht als der von H. Thurnwald und A. A. Benedetti-Pichler vorangehend gemeint. Ihre Erwähnung sollte bloß eine gewisse Gleichzeitigkeit der Bearbeitung des Problems der Mikro-Mineralanalyse an verschiedenen Stellen aufzeigen.

Das Kriterium „gründlich fundierte Arbeitsweise (well founded procedure)“ trifft jedoch auch für meine seinerzeitigen Morogoroerzanalysen zu, da ich, wie dort angegeben, die Mikromethoden durch Makroanalysen überprüft habe. Dies ist neben der Methode der Standardlösungen, die ich und meine Mitarbeiter gegenwärtig außerdem verwenden, der zweite mögliche Weg einer Kontrolle. Daß auch A. A. Benedetti-Pichler ihn anerkennt, ist daraus zu ersehen, daß er ihn bei den erwähnten Bronzeanalysen ebenfalls angewendet hat. Meine Makroanalysen wurden nach erprobten Methoden, die in der Literatur anerkannt worden sind[2], ausgeführt, so daß an ihrer Richtigkeit nicht zu zweifeln

[1] Ind. Engin. Chem. News Ed., **10**, 87 (1932), und Allg. österr. Chem.-Techn. Ztg., **50**, 35 (1932).

[2] A. Holmes, Bull. National Research Council, No. **80** (1931), p. 221; da diese Stelle wohl nicht leicht allgemein zugänglich ist, sei mir erlaubt, wörtlich

ist. Nicht zu unterschätzen ist wohl auch die Tatsache, daß diese Mikro-Mineralanalysen an einem durch den Gehalt an Uran, Thorium und seltenen Erden besondere analytische Schwierigkeiten bietenden Mineral vorgenommen wurden. An ihrer gründlichen und einwandfreien Bearbeitung ändert auch die Tatsache nichts, daß ich mit Rücksicht auf später auszuarbeitende Verbesserungen und Vereinfachungen des Analysenganges den Bericht als „vorläufige Mitteilung" bezeichnet habe. Daß auch das Kriterium „nur einige mg Ausgangsmaterial" bei meinen Analysen in Wahrheit zutrifft, habe ich wohl im Absatz 4 meiner „Bemerkungen" überzeugend dargelegt. Wien, im Februar 1933.

Bemerkungen zur quantitativen Mikro-Mineralanalyse.

Von

A. A. Benedetti-Pichler.

In Beantwortung der Richtigstellungen von Friedrich Hecht.

I regret that I am, at least in part, responsible for precipitating this discussion by not making reference to F. Hecht's work. There is, however, some justification for the omission since our work[1] deals with the development of a precise gravimetric micro procedure and only by way of example with the analysis of a mineral. F. Hecht's paper, on the other hand, is a report of analyses on minerals using micro and macro methods.

Concerning the priority claim of F. Hecht, the implication is that his procedures have been carefully tested. I will leave this decision up to the reader. New York City, July 16, 1933.

zu zitieren: "It is not proposed here to summarize the extensive literature ... but merely to direct attention to some of the leading papers that have appeared since Hillebrand ... Recents analysts who have given detailed accounts of the methods adopted for the determination of uranium, thorium and lead include Davis (104), Lokka (159), Wells (194), Hecht and Koerner (468), and Hecht and Reich-Rohrwig (118a)."

[1] Benedetti-Pichler and co-worker.

Sammelreferat.

Der Nachweis und die Bestimmung kleiner Mengen von Cholesterin und anderen Sterinen.

Von

Alfred Wasitzky.

Die Sterine sind als unentbehrliche Bestandteile des tierischen und pflanzlichen Organismus stets der Gegenstand zahlreicher Forschungen gewesen. So haben Windaus und seine Mitarbeiter in jahrzehntelangen Bemühungen die Konstitution dieser Stoffe zu ergründen vermocht und eine exakte Bestimmung des Cholesterins ermöglicht. Von besonderer Bedeutung wurde diese Körperklasse in neuerer Zeit durch ihren Zusammenhang mit dem Vitamin D, dessen Provitamin das Ergosterin ist, und daraus bereits von A. Windaus[1] und seinen Mitarbeitern sowie von F. A. Askew[2] und dessen Mitarbeitern in kristallisierter Form rein dargestellt wurde. Von großem Interesse sind auch die Zusammenhänge zwischen dem Cholesteringehalt des Blutes und den Immunitätsvorgängen im Organismus. Von praktischer Bedeutung ist der Nachweis des Cholesterins, bezw. Phylosterins zur Unterscheidung tierischen und pflanzlichen Fettes. Zur Beantwortung aller dieser Fragen haben mikrochemische Methoden der chemisch-biologischen Forschung wertvolle Dienste geleistet, und es sollen diese daher zusammenfassend besprochen werden.

A. Qualitative Reaktionen der Sterine.

Die qualitativen Reaktionen sind fast durchweg Farbenreaktionen. Es seien hier nur die neueren wiedergegeben:

[1] Ztschr. physiol. Chem., **203**, 70 (1931).

[2] Proceed. Roy. Soc. London, Serie B. **109**, 488 (1932).

V. E. Levine und E. Richman[3] berichten über eine empfindliche Reaktion des Cholesterins und Ergosterins: Eine Lösung von Cholesterin in Chloroform gibt, beim Überschichten von konzentrierter Schwefelsäure mit einem Gehalt von 0,5% Natriumselenit, eine purpurrote Färbung in der oberen Schicht und eine rot- bis dunkelbraune Färbung ohne Fluoreszenz in der unteren Schicht. Diese Reaktion tritt noch in einer 0,001%igen Cholesterinlösung auf. Enthält die Schwefelsäure statt Natriumselenit die gleiche Menge Natriumtellurit, so färbt sich die obere Schicht rot bis orange und die untere Schicht rotbraun bis hellorange mit grüner Fluoreszenz. Bei Ergosterin färbt sich immer nur die Säureschicht und nicht die Chloroformschicht. Bei bestrahltem Ergosterin soll die Reaktion schneller eintreten. Nach R. Meesemacker[4] gibt eine Lösung von 0,01 g Ergosterin in 5 ccm Chloroform beim Schütteln mit 2 ccm Essigsäureanhydrid und 2 g wasserfreiem Zinkchlorid zuerst eine Rosafärbung, die nach einer halben Stunde in eine Grünfärbung übergeht. Die Rosafärbung tritt noch mit 0,01 mg Ergosterin in 1 ccm Chloroform auf, die Grünfärbung noch mit 0,1 mg Ergosterin und ist tagelang beständig. Dieselbe Reaktion geben Cholesterin, das Phytosterin der Kakaobutter, Abietinsäure und Terpene. Eine Lösung von unbestrahltem Ergosterin in Chloroform gibt mit wasserfreiem Zinkchlorid oder Phosphorpentoxyd Rosafärbung, bestrahltes oder längere Zeit dem Tageslicht ausgesetztes Ergosterin gibt mit diesen Reagenzien Grünfärbung. Zwischen der Intensität der Grünfärbung und der Dauer der Bestrahlung scheint nach Ansicht des Verfassers eine Proportionalität zu bestehen. O. Rosenheim und R. K. Callow[5] empfehlen als Reagens auf Sterine und deren Derivate eine Lösung von 25 g Merkuriacetat in 100 ccm Salpetersäure (D 1,42). Diese gibt mit den Chloroformlösungen von Allocholesterin, Allositosterin, Cholesterilen, γ-Cholestan und β-Cholesterin eine Rotfärbung mit einer Absorption bei 500 $\mu\mu$, die durch die Doppelbindung $\Delta^{1,2}$ oder $\Delta^{1,18}$ verursacht sein könnte. Cholesterin, Koprosterin und die Phytosterine mit Ausnahme des Ergosterins geben keine Farbreaktion. Ergosterin gibt in verdünnter Lösung eine blaugrüne, in konzentrierter Lösung eine gelbe

[3] Proceed. Soc. exper. Biol. a. Med., 27, 832 u. 833 (1930).
[4] C. r., 190, 216 (1930).
[5] Biochem. Journ., 25, 74 (1931).

Färbung. Reines Vitamin D gibt eine vorübergehende Rotfärbung, die dann in Olivgrün übergeht. Vitamin-A-haltige Stoffe, Carotin, Cholatriensäure und Oxycholesterin geben eine Blaufärbung. Zum Nachweis von bestrahltem Ergosterin (Vitamin D) wurde von W. Stoeltzner[6] eine Reaktion mit Phosphorpentoxyd angegeben, bei welcher zuerst eine rötliche Färbung eintritt, die allmählich dunkler und schließlich fast schwarz wird. Diese Reaktion wurde aber von H. Forschner und A. Hottinger[7] als unspezifisch abgelehnt. Nach K. Yamasaki[8] bewährt sich zum Nachweis von Cholesterin und Oxycholesterin in Gewebsschnitten und im Reagensglas ein Reagens aus zwei Teilen Alkohol und acht Teilen konzentrierter Schwefelsäure. Cholesterin zeigt dabei eine purpurrote, Oxycholesterin eine dunkelblaue Färbung. In gleicher Weise können Gemische von drei Teilen Alkohol und sieben Teilen Schwefelsäure, von drei Teilen Wasser und sieben Teilen Schwefelsäure, von drei Teilen Eisessig und sieben Teilen Schwefelsäure und schließlich von drei Teilen Phosphorsäure und sieben Teilen Schwefelsäure verwendet werden. E. P. Häussler und E. Bräuchli[9] berichten über eine spezifische Farbenreaktion des Ergosterins und seiner Umwandlungsprodukte. Sie gehen von der Annahme aus, daß die von M. Tortelli und R. Jaffe[10] angegebene Reaktion zum Nachweis von Lebertran in Ölen für Ergosterin spezifisch sei, da doch die antirachitische Wirkung des Lebertrans auf dem Gehalt an Vitamin D, welches aus dem Ergosterin gebildet wird, beruht. Die Reaktion wird so durchgeführt, daß 5 ccm des zu untersuchenden Öles in 10 ccm Chloroform gelöst, mit 1 ccm Eisessig versetzt und nach Zusatz von 2,5%iger Brom-Chloroformlösung gut durchgeschüttelt werden. Bei Anwesenheit von Lebertran entsteht eine Grünfärbung. Die Verfasser überprüften die Reaktion und fanden sie bei Cholesterin, Chol-, Glykochol- und Taurocholsäure sowie Digitaligenin negativ, dagegen bei Ergosterin und dessen Derivaten positiv. An Stelle von Rhamnose oder δ-Methylfurfurol verwendet

[6] Münch. med. Wschr., **1928**, **II**, 1584.

[7] Münch. med. Wschr., **1929**, I, 156.

[8] Tukuoka Okwadoigaksi Zasshi, **24** 79 (1931), nach Ber. ges. Physiol., **64**. 18 (1932).

[9] Helv. chim. Acta, **12**, 187 (1929).

[10] Chem.-Ztg., **38**, 14 (1925).

N. Dobrewa[11] bei der Reaktion von C. Neuberg[12] eine 4%ige Lösung von Arabinose oder eine verdünnte Lösung von Furfurol. J. M. Heilbronn und F. St. Spring[13] untersuchten eine Reihe von Farbreaktionen und deren Absorptionsspektren.

B. Die quantitative Bestimmung kleiner Mengen von Cholesterin.

1. Kolorimetrische Methoden.

Von allen Bestimmungsmethoden des Cholesterins beruht weitaus die größte Zahl auf dem kolorimetrischen Prinzip, wenn auch der Wert dieser Methoden von vielen Seiten stark angezweifelt wird. Sie danken ihre relative Beliebtheit wohl dem Umstande, daß sie gewiß recht einfach und rasch durchzuführen sind, was für klinisch-chemische Untersuchungszwecke, für die sie meistens angewendet werden, ja von besonderer Bedeutung ist, zumal für diese Zwecke eine besondere Genauigkeit nicht erforderlich ist. Außerdem muß zugegeben werden, daß auch die kolorimetrischen Cholesterinbestimmungen bei exakter Durchführung, besonders wenn sie stets vom selben Analytiker ausgeführt werden, eine über das gewöhnlich angenommene Maß hinausgehende Genauigkeit besitzen und brauchbare Vergleichswerte liefern. Die Mehrzahl beruht auf der Farbenreaktion von C. Liebermann und N. Burchardt[14]. Eine Lösung von Cholesterin in Chloroform gibt beim Zusatz von Essigsäureanhydrid und wenig Schwefelsäure beim Stehen unter Lichtabschluß im Brutschrank eine Grünfärbung. Eine der häufigst verwendeten Methoden stammt von W. Authenrieth und A. Funk[15]: 1 ccm Serum wird mit 10 ccm 25%iger Kalilauge zwei Stunden im siedenden Wasserbad verseift. Nach dem Erkalten wird mehrmals mit Chloroform ausgeschüttelt, die wasserhaltige Chloroformlösung mit entwässertem Natriumsulfat getrocknet und dann in einem Meßkolben auf 25 ccm aufgefüllt. Zu je 5 ccm der Lösung werden 2 ccm Essigsäureanhydrid und drei Tropfen konzentrierte Schwefelsäure gegeben. Nach zehn Minuten langem Stehen im Dunkeln bei

[11] Jahrb. Univ. Sofia, Med. Fak., **10**, 493 (1931).
[12] C., **1904**, I, 1434.
[13] Biochem. Journ., **24**, 133 (1930).
[14] C., **1890**, I, 25.
[15] Münch. med. Wschr., **1913**, 23.

32 bis 35° C ist die Farbe optimal entwickelt. Man vergleicht die Färbung bei der Originalmethode mit einem Standardkeil, der eine anorganische Salzlösung enthält. Ebenso kann man auch mit einer gleich behandelten Cholesterinlösung von bekanntem Gehalte vergleichen. Nach dem Verfahren von W. R. BLOOR[16] werden 3 ccm Serum durch Zusatz von 25 ccm Äther-Alkohol (1 : 3) enteiweißt, filtriert und 10 ccm des Extrakts zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in Chloroform aufgenommen und darin das Cholesterin nach der LIEBERMANN-Reaktion bestimmt. V. C. MYERS[17] saugt das Serum auf Sand auf, trocknet und extrahiert mit Chloroform. Die weitere Verarbeitung geschieht wie oben. A. GRIGAUT[18] behandelt das Serum mit einer 1%igen Lösung von Ätznatron in 50%igem Alkohol im Wasserbad. Diese Lösung wird mit Äther ausgeschüttelt, der Äther mit Wasser gewaschen, dann verdampft und der Rückstand in Chloroform gelöst. Die Bestimmung wird nach demselben Prinzip vorgenommen. Ein Verfahren zur Bestimmung des Gesamtcholesterins in 0,25 ccm Blut wird von S. LEIBOFF[19] angegeben. Man läßt das Blut auf eine Scheibe aus Filtrierpapier, die in der Mitte eine Öffnung zum Durchtritt des Chloroformdampfes trägt, aufsaugen. Das Filter kommt in eine Eprouvette, die eine Einschnürung trägt, um ein Hineinfallen des Filters zu verhindern, welche mit 5 ccm Chloroform beschickt ist. Als Rückflußkühler wird eine engere Eprouvette, durch die Kühlwasser durchgeleitet wird, eingehängt. Man erhitzt zum Sieden und extrahiert eine halbe Stunde. Nach dieser Zeit wird das Chloroform in der Eprouvette genau auf 5 ccm ergänzt und im übrigen wie bei den vorigen Methoden verfahren. In späteren Mitteilungen berichtet der Verfasser über technische Verbesserungen. Eine einfache Mikromethode stellt das Verfahren von W. ENGELHARDT und L. SMIRNOV[20] dar. 0,1 ccm Blut wird in ein Reagensgläschen ausgeblasen, die Pipette mit 0,1 ccm Wasser nachgespült und noch 0,1 ccm 25%ige Kalilauge

---

[16] Journ. biol. Chem., **24**, 227 (1916).

[17] Journ. biol. Chem., **36**, 147 (1918).

[18] Ztschr. physiol. Chem., **65**, 110 (1910).

[19] Journ. biol. Chem., **61**, 177 (1924).
Journ. lab. u. clin. Med., **10**, 857 (1925), **11**, 777 (1926), u. **15**, 776 (1930).

[20] Žurnal eksperimental'noj biologii i mediciny, **1926**, 7, 108; nach Ber. ges. Physiol., **37**, 369 (1927).

zugegeben. Dann wird eine halbe Stunde am Wasserbad verseift. Nach dem Erkalten werden 1,5 ccm Chloroform und ungefähr 0,15 g verwittertes sekundäres Natriumphosphat ($Na_2HPO_4 . 2\,H_2O$) zugesetzt. Die Mischung wird durchgerührt und dann einige Zeit stehengelassen. Dabei nimmt das Natriumphosphat die gesamte Feuchtigkeit als Kristallwasser ($Na_2HPO_4 . 12\,H_2O$) auf. Nun wird das in ein Wasserbad von 70 bis 80° C so lange eingestellt, bis das Chloroform zu sieden beginnt. Gleichzeitig schmilzt das Phosphat in seinem Kristallwasser und erstarrt beim raschen Abkühlen unter der Wasserleitung in dünner Schicht an der Wand des Gläschens. Dadurch läßt sich das Chloroform leicht abgießen, und es wird nach Auffüllen auf 2,5 ccm die weitere Verarbeitung nach Authenrieth (siehe diesen) durchgeführt. Ähnlich den bisher genannten sind die von D. Acel[21], M. Ling Schmorl[22], D. C. V. Shen[23], A. Berhard und A. J. Trekter[24], R. Ehman und J. B. Taussig[25], E. Day und A. Bollinger[25] und F. Rappaport und H. Engelberg[26] mitgeteilten Methoden. Ch. Dragoni[27] versucht die Methode von A. Grigaut zu verbessern, indem er mehrmals mit kleinen Äthermengen ausschüttelt und diesen statt mit Wasser mit 0,5%iger Kochsalzlösung ausschüttelt. Beim Vergleich mit der Originalmethode findet er bei seiner Arbeitsweise 100 mg% und bei der Originalmethode 75 mg% Cholesterin im Serum. J. A. Gardner und F. W. Fox[28] finden, daß bei der Verseifung mit alkoholischem Kali oder Natron in den Ätherauszug ein hellbraunes Harz übergeht, welches sich dann bei Durchführung der Liebermann-Reaktion braun bis grün färbt. Diese Substanz stammt vielleicht aus Spuren von Aldehyden oder ähnlichen Verunreinigungen des Alkohols und ist auch durch Kochen des Alkohols mit Ätznatron nicht zu entfernen. Die Bestimmung des Cholesterins in pathologischen Harnen führt W. Grunke[29] in folgender Weise durch.

[21] Dtsch. med. Wschr., **54**, 431 (1928).
[22] Journ. biol. Chem., **76**, 361 (1928).
[23] Clin. Journ. Physiol., **3**, 405 (1929); nach Ber. ges. Physiol., **54**, 646 (1930).
[24] Journ. lab clin. Med., **16**, 1225 (1931).
[25] Journ. lab. clin. Med., **17**, 274 (1931).
[26] Klin. Wschr., **1931**, I, 700.
[27] Journ. d'urol., **24**, 421 (1927); nach Ber. ges. Physiol., **45**, 86 (1928).
[28] Biochem. Journ., **15**, 376 (1921).
[29] Biochem. Ztschr., **132**, 543 (1922).

200 bis 300 ccm Harn werden auf dem Wasserbad auf ungefähr 20 bis 30 ccm eingeengt und dann mit 40 ccm 25%iger Kalilauge verseift. Die Lösung wird auf 500 ccm aufgefüllt, mit 1 bis 2 g Calciumhydroxyd versetzt, gut vermischt und dann filtriert. Der Rückstand, der das gesamte Cholesterin enthält, wird getrocknet, mit 25%iger Salzsäure zerlegt und die Lösung mit Chloroform ausgeschüttelt. In der Chloroformlösung wird dann das Cholesterin kolorimetrisch bestimmt. L. J. Gamble und K. D. Blackfan[30] berichten über eine Anwendung des Verfahrens von Authenrieth zur Bestimmung des Cholesterins in Milch und Faeces. Danach werden 10 ccm Milch mit 20 ccm 30%iger Kalilauge durch zweistündiges Erhitzen am Wasserbad verseift. Der ungefähr 15 ccm betragende Rückstand wird in einen 100 ccm fassenden Meßzylinder gebracht und mit einer Mischung von 25 ccm Alkohol und 60 ccm Petroläther fünf Minuten lang geschüttelt. Dann wird die obere Schicht abgehoben und die Seifenlösung nochmals mit 60 ccm Petroläther durchgeschüttelt. Die vereinigten Auszüge werden im Scheidetrichter mit Wasser gewaschen und dann am Wasserbad eingedunstet. Der in Chloroform gelöste Rückstand wird nach der Originalmethode weiter behandelt. Faeces werden mit einem Gemisch von drei Teilen Alkohol und einem Teil Äther drei Stunden extrahiert und ein aliquoter Teil der Lösung nach Abdampfen des Lösungsmittels wie oben verseift und weiter behandelt.

M. Fiorentino[31] isoliert vor der Durchführung der Farbreaktion das Cholesterin als Digitonid (näheres über die Füllung des Cholesterindigitonids bei den gravimetrischen Methoden) und bestimmt darin das Cholesterin nach einer Modifikation der Liebermann-Burchardt'schen Reaktion. 1 ccm Serum, Plasma oder Blut wird mit 15 ccm 25%iger Kalilauge am Sandbad bei 110° C drei Stunden lang erhitzt, worauf die Verseifung vollständig ist. Dann läßt man auf 50° C abkühlen, setzt 25 ccm Wasser und ebensoviel Äther zu und schüttelt fünf Minuten. Der Äther wird abgehoben und das Ausschütteln noch zweimal mit je 20 ccm Äther wiederholt, wobei der Kolbeninhalt vor jedem Ausschütteln auf 50° C erwärmt wird. Schließlich säuert man den Rückstand mit 8 ccm rauchender Salz-

[30] Journ. biol. Chem., **42**, 401 (1920).
[31] Riforma med., **1929**, I, 845.

säure an und schüttelt noch zweimal mit je 10 ccm Äther aus. Die vereinigten Ätherauszüge werden im Scheidetrichter zuerst mit angesäuertem und dann mit reinem Wasser durchgeschüttelt und die so gereinigte ätherische Lösung zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in 7 ccm Alkohol gelöst und in einem Zentrifugenröhrchen mit 4 ccm 1%iger Digitoninlösung versetzt. Nach fünf Minuten langem Erhitzen im siedenden Wasserbad läßt man erkalten, setzt unter Umschütteln fünf Tropfen Wasser zu und zentrifugiert. Der Niederschlag wird nacheinander mit 3 ccm 90%igem Alkohol, 2 ccm absolutem Alkohol und 4 ccm Äther gewaschen. Dann löst man denselben in 1 ccm Eisessig, setzt 8 ccm Essigsäureanhydrid und 0,2 ccm Glycerin (30° Bé) zu, mischt gründlich durch und gibt noch 0,2 ccm Trichloressigsäure und 0,1 ccm konzentrierte Schwefelsäure zu. Nach 10 Minuten langem Erhitzen im Wasserbad und nachfolgendem Abkühlen wird kolorimetriert. Als Standard dient eine Lösung von 2,0568 g Cholesterindigitonid in 250 ccm Eisessig. 1 ccm dieser Lösung entspricht 2 mg Cholesterin. L. Tutkewitsch[32] extrahiert 200 bis 250 mg Blut mit Petroläther, dampft den Extrakt auf 1 ccm ein und fällt das Cholesterin mit 0,1 ccm einer 0,5%igen alkoholischen Digitoninlösung. Die Fällung wird über Nacht stehengelassen, abzentrifugiert und dann der Niederschlag durch 50 Minuten langes Erhitzen am Wasserbad mit 0,3 ccm 25%iger Kalilauge zerlegt. Die weitere Behandlung der Probe geschieht nach der Methode von W. Engelhardt und L. Smirnov (siehe diese). Yoshimatsu Shun Ichi[33] löst den Digitonidniederschlag in konzentrierter Schwefelsäure und kolorimetriert mit dem Phenolreagens von O. Folin und W. Denis[34] (Phosphormolybdänwolframsäure). Der mittlere Fehler dieser Methode soll bei Anwendung von 0,05 ccm Blut ± 4% betragen. Über ein kolorimetrisches Verfahren mit vorangehender Digitoninfällung berichtet auch A. Grigaut[35].

J. V. Steinle und L. Kahlenberg[36] benützen zur Bestimmung des Cholesterins im Blut die Farbreaktion mit Antimonpentachlo-

[32] Biochem. Ztg., **213**, 439 (1929).

[33] Tohoku Journ. exper. Med., **17**, 147 (1931); nach Ber. ges. Physiol., **62**, 140 (1931).

[34] Journ. biol. Chem., **22**, 305 (1914).

[35] C. r. soc. Biol. Paris, **112**, 34 (1933).

[36] Journ. biol. Chem., **67**, 425 (1926).

rid. (KAHLENBERG[37].) 5 ccm Blut oder Serum werden mit 10 bis 15 g Gips eingetrocknet und die zerriebene Masse mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformlösung wird auf ungefähr 5 ccm eingeengt, genau aufgefüllt und mit 1 ccm einer 20%igen Lösung von Antimonpentachlorid in Chloroform versetzt. Nach 10 Minuten langem Stehen setzt man noch 9 ccm Chloroform zu, läßt abermals 10 Minuten stehen und kolorimetriert. Phytosterin kann nach demselben Verfahren bestimmt werden, nur gibt es eine andere Farbnuance und braucht längere Zeit zur Entwicklung der Farbe.

A. BERNOULLI[38] berichtet über eine Methode, die auf der Reaktion von L. TSCHUGAEFF[39] basiert. Eine Lösung von Cholesterin in Eisessig gibt mit Acetylchlorid und wasserfreiem Zinkchlorid eine Rotfärbung, die in einer Verdünnung von 1 : 80.000 noch deutlich wahrnehmbar ist und sowohl mit freiem als auch verestertem Cholesterin eintritt. Die gleiche Reaktion gibt Phytosterin. Ergosterin gibt in der Kälte eine Gelbfärbung, die beim Erhitzen grünstichig und dann braun wird. Die Ausführung geschieht in der Weise, daß 1 ccm Cholesterinlösung mit 1 ccm Acetylchlorid und 0,1 g Zinkchlorid in einem 10 ccm fassenden Meßzylinder 10 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt wird, wobei die Färbung von Rosa über Orange in Braungelb übergeht. Nach dem Erkalten wird mit Eisessig oder Essigäther auf 10 ccm aufgefüllt und kolorimetriert. Der Verfasser kündigt den Bericht über eine klinische Anwendung dieser Methode durch A. GIGON und A. TURNHERR an. J. C. FORBES[40] bringt eine einfache Mikromethode, bei der 0,5 ccm Plasma mit 2 g Doucil (eine amerikanische Asbestart) und 9 ccm Chloroform in einem verschließbaren Meßzylinder versetzt werden und dieser unter gelegentlichem Schütteln eine Stunde liegend aufbewahrt wird. Nach dieser Zeit wird filtriert und in 5 ccm des Filtrats das Cholesterin kolorimetrisch bestimmt. Nach einer späteren Mitteilung wurde die Methode gemeinsam mit H. IRVING[41] auch für die Bestimmung im Vollblut ausgearbeitet. A. BLOCH[42]

[37] Journ. of biol. Chem., **67**, 425 (1926).
[38] Helv. chim. Acta, **15**, 274 (1932).
[39] B., **42**, 4634 (1910).
[40] Journ. lab. clin. Med., **16**, 520 (1931).
[41] Journ. lab. clin. Med., **16**, 909 (1931).
[42] Schweiz. med. Wschr., **1931**, I, 108.

gründet eine Cholesterinbestimmungsmethode auf seiner Wahrnehmung, daß bei der Verseifung des Serums mit Barytwasser das gesamte Cholesterin quantitativ an das aufgefallene Bariumkarbonat absorbiert wird. Aus dem Niederschlag kann es dann durch ein Alkohol-Äthergemisch wieder ausgewaschen werden und wird nach Abdampfen des Lösungsmittels und Aufnehmen in Chloroform kolorimetrisch bestimmt. S. KRASTELEWSKY[43] untersucht die Reaktion von E. SALKOWSKY[44] auf ihre Eignung für quantative Zwecke, und findet, daß unter bestimmten Bedingungen eine einheitliche orangerote Färbung erhalten wird, deren Stärke der vorhandenen Cholesterinmenge genau proportional ist. Im Gegensatz zu der Probe von LIEBERMANN-BURCHARDT wird die Reaktion durch andere Stoffe des Blutplasmas nicht beeinflußt. Bei der Durchführung der Reaktion muß jede Spur von Feuchtigkeit ferngehalten werden, da schon die aus der Luft angezogenen Feuchtigkeitsmengen genügen, um die Farbe nach Rosa, Lila oder Kirschrot umschlagen zu lassen. Außerdem darf die Reaktionstemperatur nicht über + 4° C betragen und es muß für vollständigen Lichtabschluß gesorgt werden. Die Durchführung der Cholesterinbestimmung im Serum gestaltet sich wie folgt: 1 ccm Serum wird in 5 ccm Alkohol eingetropft und das Ganze in einem Thermostat bei 55 bis 60° C zur Trockne eingedampft, wozu ein Tag erforderlich ist. Die Trockensubstanz wird in einem Mörser gepulvert, in eine Flasche mit Glasstopfen gebracht, darin mit 5 ccm Chloroform übergossen und die Mischung nach einer Viertelstunde mit 5 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Nun wird ein bis zwei Minuten geschüttelt und nachher 6 bis 12 Stunden in den Eisschrank gestellt. Nachher wird die Chloroformlösung in ein Röhrchen, welches absolut trocken sein muß, gebracht und die Färbung mit der einer Reihe von Teströhrchen verglichen, die 0.01 bis 100 mg Cholesterin enthalten. D. ABRAMSOHN[45] findet nach Überprüfung dieser Methode, daß sie durchaus brauchbare Werte liefert. O. COQUELET[46] untersucht die optimalen Bedingungen der Furfurol-Schwefelsäure-Reaktion des Cholesterins für dessen quantitative Bestimmung und berichtet an-

[43] Biochem. Ztschr., **143**, 403 (1923).
[44] Ztschr. physiol. Chem., **26**, 569 (1887).
[45] Biochem. Ztschr., **198**, 233 (1928).
[46] C. r. soc. Biol., **97**, 747 und 749 (1927).

schließend daran über eine auf dieser Reaktion beruhende Methode. 0,04 ccm Plasma oder Serum werden auf einem entfetteten Filtrierpapier aufgesaugt und mit einer Mischung von gleichen Teilen Alkohol und Äther eine Stunde lang extrahiert. Dann wird die Lösung nach Zugabe von einem Tropfen 5%iger Natronlauge eingedampft und der Rückstand bei einer 80 bis 90° C nicht übersteigenden Temperatur getrocknet. Der Rückstand wird in Chloroform aufgenommen, die Lösung eingedampft und der verbliebene Rückstand in 0,5 ccm Alkohol aufgenommen. Zu dieser Lösung werden 0,1 ccm alkoholische Furfurollösung und vorsichtig 0,5 ccm konzentrierte Schwefelsäure (Unterschichten!) gegeben. Sodann wird durch kurzes und kräftiges Schütteln gemischt, worauf zunächst eine Rosafärbung entsteht, die bald in ein Blau übergeht. Nach fünf Minuten verdünnt man mit 4 ccm Chloroform-Alkohol (3 : 2 Vol.) und vergleicht die Farbe mit einer Standardlösung, die 0,1 mg Cholesterin enthält. In ähnlicher Weise läßt sich auch der Cholesteringehalt der Galle in 0,1 bis 0,5 ccm Probe bestimmen.

Um die Verschiedenheit der Farbnuance zwischen Probe und Standard auszuschalten, bestimmen E. Brill und G. Hopf[47] die Lichtabsorption der nach Authenrieth entwickelten Farbe im Stufenphotometer. H. Bohn und O. Bickenbach[48] arbeiten ebenfalls mit dem Stufenphotometer. Da sie fanden, daß die Werte der Lichtabschwächung zwischen 30 bis 40° C am geringsten mit wechselnder Temperatur schwanken, empfehlen sie, bei 37° C zu arbeiten. Auch H. Theorell und G. Widström[49] führen die kolorimetrische Bestimmung des Cholesterins im Blut im Stufenphotometer durch. P. Laurent Gérard[50] schlägt vor, die kolorimetrische Bestimmung nicht im gemischten, sondern im gefilterten Licht durchzuführen.

Am Ende dieses Abschnittes seien jene Arbeiten erwähnt, die sich mit der Überprüfung und Kritik der kolorimetrischen Methoden beschäftigen. J. Feigl[51] untersucht und vergleicht eine Reihe kolorimetrischer Methoden zur Cholesterinbestimmung und kommt dabei zu dem Schlusse, daß diese bei exakter Ausführung richtige Werte

[47] Münch. med. Wschr., **1930**, I, 142.
[48] Ztschr. exper. Med., **71**, 566 (1930).
[49] Ztschr. exper. Med., **75**, 699 (1931).
[50] C. r. soc. Biol., **98**, 1325 (1928).
[51] Ztschr. ges. exper. Med., **11**, 178 (1920).

zu liefern imstande sind; daß aber technische Fehlerquellen reichlich gegeben seien. Dagegen behauptet E. Müller[52], daß selbst bei Vergleich von reinen Cholesterinlösungen unter den gleichen Bedingungen manchmal die Farbnuance variiert. Außerdem wäre es mit keiner Methode möglich, einen vollkommen ungefärbten und von störenden Verunreinigungen befreiten Extrakt herzustellen. W. Nekludow und S. Chalatow[53] finden, daß die kolorimetrische Methode von A. Grigaut (siehe diesen) in 20 bis 30% der Fälle eine von der Standardlösung abweichende Färbung gibt und daß die Werte um 10 bis 12% zu hoch sind, obwohl im Rückstand etwas Cholesterin zurückbleibt. Sehr gute Werte liefert nach ihren Angaben das Verfahren von S. Krastelewsky (siehe diesen), welches 95 bis 98% des Cholesterins ergibt. Nach J. A. Gardner und M. Williams[54] ist die kolorimetrische Cholesterinbestimmung nur im Serum und im Vollblut möglich. Im Gewebe und in der Milch liefert nur die gravimetrische Methode exakte Werte. Bei gewissen Extrakten stört auch nach der Fällung mit Digitonin ein bei der Anstellung der Farbreaktion auftretender braunroter Ton, dessen Ursache noch ungeklärt ist. O. Mühlbock und C. Kaufmann[55] vergleichen die Methode von Bloor und die Methode von Myers mit dem von ihnen ausgearbeiteten gravimetrischen Verfahren. Nach ihrem Bericht sind die Werte nach der ersten Methode um maximal 76% und nach der zweiten um maximal 38% höher als nach der der Verfasser, weshalb sie die Anwendung der beiden Verfahren ablehnen. A. Bloch[56] untersucht den Einfluß aller in Frage kommenden Faktoren, wie Menge des Essigsäureanhydrids, der Schwefelsäure, des Chloroforms und des Cholesterins als auch Höhe der Temperatur und die Dauer der Belichtung bei der Liebermann Reaktion. Der Verfasser gibt an, daß es trotz der verwickelten Beziehungen der Komponenten zueinander möglich sei, einheitliche Reaktionsprodukte zu erhalten und daß daher eine Bestimmung des Cholesterins nach dieser Reaktion berechtigt erscheine.

---

[52] Beiträge z. path. Anat. u. z. allg. Pathol., **80**, 140 (1928).
[53] Biochem. Ztschr., **208**, 60 (1929).
[54] Biochem. Journ., **15**, 363 (1921).
[55] Biochem. Ztschr., **233**, 222 (1931).
[56] Biochem. Ztschr., **257**, 171 (1933).

2. Spektrometrische Methoden.

Im Anschluß an die im vorangehenden Abschnitt beschriebenen kolorimetrischen Methoden sei auch der spektrometrischen Bestimmungsmethoden des Cholesterins und verwandter Körper Erwähnung getan. Eine spektrometrische Methode der Cholesterinbestimmung wurde von J. Lifschütz[57] angegeben, der mittels einer von ihm ausgearbeiteten Modifikation eine Grünfärbung entwickelte und den Extinktionskoeffizienten dieser Lösung ermittelte. A. Theorell[58] verbesserte dieses Verfahren in einigen Punkten, doch dürften diese Methoden sich kaum einbürgern, da eine geeignete Apparatur ziemlich kostspielig ist und andere genaue Methoden zur Verfügung stehen. Dagegen hat die Bestimmung des Ultraviolettabsorptionsspektrums bei der Erforschung des Vitamins D unersetzliche Dienste geleistet. So konnte R. Pohl[59] auf diese Weise den Nachweis erbringen, daß nicht das Cholesterin, sondern das darin in Spuren als Verunreinigung enthaltene Ergosterin durch die Ultravioletbestrahlung aktiviert wird. Mit dieser Methode wurden quantitative Bestimmungen des Vitamins D von E. H. Reering und A. von Wijk[60] in den von ihnen hergestellten Bestrahlungspunkten vorgenommen, doch ist E. H. Reering[61] der Ansicht, daß eine quantitative Bestimmung des Vitamins D in therapeutisch verwendeten Präparaten auf diesem Wege wenig Aussicht biete, da der Gehalt an wirksamer Substanz zu klein sei. Neuerdings konnte L. Fuchs[62] zeigen, daß man mit Hilfe des Ultraviolettabsorptionsspektrums das Vitamin D in einer Konzentration von 0,3 mg pro 1 g Öl mit einem maximalen Fehler von 30% bestimmen kann.

3. Nephelometrische Methoden.

Über ein nephelometrisches Verfahren zur Bestimmung von Cholesterin im Blutserum berichten O. Mühlbock und C. Kaufmann[63]: 3 ccm Serum werden langsam in 50 ccm Alkohol-Äther-

[57] Biochem. Ztschr., **48**, 373 (1913), **54**, 212 (1913), **62**, 219 (1914).
[58] Biochem. Ztschr., **175**, 297 (1926).
[59] Naturwiss., **15**, 433 (1927).
[60] Nederl. Maandschr. Geneesk., **17**, 1 (1930).
[61] Chem. Weekbl., **29**, 645 (1932).
[62] Pharm. Presse, **1933**, 1.
[63] Klin. Wschr., **1931**, I, 284.

mischung eingetropft. Nach einiger Zeit filtriert man vom Eiweißniederschlag und verdampft das Filtrat zur Trockne; den Rückstand zieht man mehrmals mit Aceton aus und füllt auf 25 ccm auf. Davon werden 8 ccm entnommen und in einem 25 ccm fassenden Philips-Becher auf 2,5 ccm eingeengt. Man setzt 0,5 1%ige alkoholische Digitoninlösung und 0,5 ccm Wasser zu und verdampft langsam im Laufe einer halben Stunde das Aceton, bis der Geruch danach verschwunden ist und ein breiartiger Rückstand hinterbleibt. Dieser wird mit 20 ccm Äther-Acetonmischung (10 : 4) eine halbe Stunde stehengelassen und dann durch ein hartes Filter dekantiert. Das Cholesterindigitonid wird in heißem Methylalkohol gelöst und zur Trockne verdampft, der Rückstand wieder in 5 ccm heißem Methylalkohol gelöst und mit 5 ccm Wasser verdünnt. Die entstehende Trübung wird mit Standardlösungen verglichen, die 0,35, 0,50 und 0,65 mg Cholesterin, gelöst in einer Mischung 5 ccm Methyl- und 10 ccm Äthylalkohol, enthalten und mit 0,5 ccm 1%iger Digitoninlösung und 5 ccm Wasser versetzt werden.

Gravimetrische Methoden.

Die gravimetrische Bestimmung des Cholesterins beruht auf der Eigenschaft der Sterine, mit Saponinen Verbindungen einzugehen. A. Windaus[64] fand im Digitonin eine für diesen Zweck besonders geeignete Substanz. Durch Zusammengießen der alkoholischen Lösungen von Cholesterin und Digitonin erhält man sofort einen kristallinischen Niederschlag in Form feiner Nadeln, der aus einer Verbindung von Cholesterin und Digitonin besteht. Die Vereinigung geht ohne Wasseraustritt gemäß der Formel

$$C_{27}H_{46} + C_{55}H_{94}O_{28} = C_{82}H_{140}O_{29}$$

Cholesterin Digitonin Cholesterindigitonid

vor sich.

Die Reaktionsfähigkeit des Cholesterins ist an die freie Hydroxylgruppe gebunden, denn Cholesterinester reagieren mit Digitonin nicht.

Die Additionsverbindung des Cholesterins mit Digitonin ist unlöslich in Wasser, Aceton, Äther und sehr wenig löslich in kaltem,

[64] B., 42, 238 (1909).

95%igem Alkohol, leicht löslich in kochendem, absolutem Alkohol, Methylalkohol, Eisessig und besonders in Pyridin. Die Festigkeit der Additionsverbindung ist sehr groß; durch Extraktion mit Äther gelingt es nicht, sie zu zerlegen, wohl aber durch eine zehnstündige Behandlung mit siedendem Xylol, wodurch alles Cholesterin gelöst wird. So wie Cholesterin gehen alle natürlichen Sterine eine Verbindung mit Digitonin ein. Bestrahltes Ergosterin ist durch Digitonin nicht mehr fällbar.

Für die gravimetrische Bestimmung gibt A. Windaus folgende Methode an: Die zu untersuchende Substanz wird in der fünfzigfachen 95%igen Alkohols gelöst und mit einer 1%igen Lösung von Digitonin in 90%igem Alkohol solange versetzt, bis kein Niederschlag mehr ausfällt. Der Niederschlag wird in einem Goochtiegel gesammelt, gewaschen, bei 110° getrocknet und gewogen. Durch Multiplikation mit dem Faktor 0,2431 erhält man die gesuchte Menge Cholesterin, meist genügt der Faktor 0,25. J. Fex[65] verwendet diese Methode zur Bestimmung des Cholesterins im Serum. 10 bis 20 ccm Serum werden mit der doppelten Menge 2%iger Natronlauge eine halbe Stunde am siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Erkalten wird die Lösung zweimal mit 150 ccm Äther ausgeschüttelt, wobei man jedesmal 12 Stunden stehenläßt. Die Ätherauszüge werden zur Entfernung von Alkali mit Wasser ausgeschüttelt und dann abgedampft. Der Rückstand wird in Alkohol gelöst und das freie Cholesterin mit Digitonin gefällt. Das Filtrat der Digitoninfällung, das die unveränderten Cholesterinester enthält, wird zur Trockne verdampft, mit 150 ccm Äther extrahiert und die Lösung eingedampft. Der Rückstand wird mit 5%igem Natriumalkoholat verseift und dann weiter wie oben behandelt. Eine Mikromodifikation der Methode von A. Windaus stellt das Verfahren von A. v. Szent-Györgyi[66] dar. Das zu bestimmende Cholesterin, dessen Menge nicht mehr als 4,5 mg betragen soll, wird in einem Mikrobecherchen in 2 ccm Aceton gelöst und mit einer 2%igen Lösung von Digitonin in 80%igem Alkohol versetzt. Man erhitzt am Wasserbad, bis ungefähr die Hälfte der Lösung verdampft ist, und läßt dann eine Viertelstunde bei Zimmertemperatur stehen. Dann wird der Niederschlag in ein Pregl'sches Filterröhrchen gebracht,

[65] Biochem. Ztschr., **104**, 82 (1920).
[66] Biochem. Ztschr., **136**, 107 (1923).

mit Wasser quantitativ übergespült, mit Aceton, Äther, Chloroform, nochmals mit Aceton und schließlich mit heißem Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen bei 100° wird gewogen und das Cholesterin wie bei WINDAUS berechnet. Der mittlere Fehler der Methode beträgt 1,5 bis 3%. Über Cholesterinbestimmungen nach der Digitoninmethode berichten auch L. WACKER und K. F. BECK[67], R. GIRARDIN und E. SPACH[68], M. PETRYNOWSKI[69], O. MÜHLBOCK und C. KAUFMANN[70] sowie R. MANKE[71]. Zur Bestimmung des Cholesterins in Organen bemerkt J. FEX (siehe diesen), daß eine Trocknung der Organe im Luftstrom vor dem Extrahieren unzulässig sei. Wohl aber erhalte man durch Vorbehandlung mit 20%iger Natronlauge, und zwar zuerst bei Zimmertemperatur und dann am schwach siedenden Wasserbad einerseits quantitative Extraktion des Cholesterins und anderseits einen so reinen Extrakt, daß sich in diesem das Cholesterin nach der Digitoninmethode exakt bestimmen lasse. Über mangelhafte Verseifung von Cholesterinestern bei den verschiedenen Verseifungsmethoden berichten J. A. GARDNER und F. W. FOX[72]. Bei der Bestimmung von Cholesterin im Vollblut soll nach J. ONIZAWA[73] das Verfahren von J. FEX (siehe diesen) keine quantitativen Ausbeuten geben. Nach Zusatz von 20% Alkohol oder Aceton findet der Verfasser vollständigen Übergang des Cholesterins in das Lösungsgemisch.

Maßanalytische Methoden.

Eine Mikromethode zur maßanalytischen Bestimmung der Lipoide im Blut wurde zum erstenmal von J. BANG[74] angegeben. Sie beruht darauf, daß Neutralfett, Cholesterin und Cholesterinester bei der Oxydation mit Chromschwefelsäure unter geeigneten Bedingungen den gleichen Verbrauch an Bichromat aufweisen. Das in üblicher Weise auf Löschpapierblättchen aufgesaugte Blut wird zunächst

[67] Ztschr. f. Kinderheilk., **27**, 288 (1921).
[68] Bull. Soc. chim. biol., **8**, 813 (1926).
[69] Sang, **2** (1928); nach Ber. ges. Physiol., **48**, 98 (1929).
[70] Klin. Wschr., **1930**, II, 2019.
[71] Biochem. Ztschr., **231**, 103 (1931).
[72] Biochem. Journ., **18**, 1058 (1924).
[73] Journ. of Biochem., **10**, 45 (1928); nach Ber. ges. Physiol., **49**, 603 (1929).
[74] J. Bang, Mikromethoden für Blutuntersuchung.

Bücherschau.

J. A. Radley and Julius Grant Fluoreszenzanalysis in ultraviolet light, Band 7 der Serie von Monographien über angewandte Chemie, London. Chapman and ltd. 219 Seiten.

Seitdem die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen soweit ausgebildet worden sind, daß sie zu Erfassungsgrenzen führen, die den Vergleich mit anderen mikrochemischen Untersuchungen in jeder Beziehung standhalten können, hat diese Methode immer mehr an Interesse für den Analytiker gewonnen. Es ist daher als ein dankenswertes Unternehmen zu begrüßen, daß RADLEY und GRANT, deren Namen jedem Fluoreszenzanalytiker wohlbekannt sind, sich der Mühe unterzogen haben, die Erfahrungen auf diesem Gebiete in übersichtlicher Weise zusammenzustellen. Das Buch ist für den Praktiker geschrieben. Nach einer kurzen theoretischen Einleitung werden Anweisungen über die Verwendung auf dem Gebiete der Mineralogie, Botanik und Histologie sowie auf jenem der organischen und anorganischen sowie der angewandten Chemie (Nahrungsmittel-, Papier-, Textil-, Gerbstoffindustrie usw.) gegeben. Reiche Literaturangaben und die Beschreibung neuer, bisher unveröffentlichter Untersuchungen der Verfasser machen das Buch besonders wertvoll. Die geschickte Anordnung des Stoffes und die klare Diktion lassen das Buch als einen vorzüglichen Behelf für den Praktiker und auch für den Anfänger auf diesem Gebiete erscheinen. M. HAITINGER.

Die Kapillarlumineszenzanalyse im pharmazeutischen Laboratorium. Leipzig. Von H. NEUGEBAUER. Verlag Dr. Willmar Schwabe, 1933. 59 Seiten.

Verfasser hat einen Ausschnitt aus der Fluoreszenzanalyse, und zwar die kapillaranalytischen Methoden, die gerade bei pharmazeutischen Untersuchungen mit so gutem Erfolg verwendet werden, eingehend studiert und in geradezu mustergültiger Weise beschrieben. Nach einer Einleitung über das Wesen der Lumineszenzanalyse folgt eine ausführliche Beschreibung der Methoden der Kapillaranalyse im sichtbaren Licht und in der Fluoreszenz. Die Methode von PLATZ und jene der langgestreckten Kapillarbilder von RAPP und ROJAHN werden einer gründlichen Kritik unterzogen und es wird auch auf quantitative Untersuchungen hingewiesen. Nach einer Beschreibung der auf dem Gebiete pharmazeutischer Kapillarlumineszenzanalyse erschienenen Arbeiten wird eine Bestimmungstabelle gegeben, mit der es möglich ist, alle gebräuchlichen homöopathischen Urtinkturen durch Kapillarbilder zu identifizieren. Das Büchlein zeichnet sich durch eine klare und übersichtliche Zusammenstellung sowie durch eine prägnante Diktion aus und bietet dem Praktiker alles, was er auf diesem Gebiete sucht, dem Forscher reichliche Anregung. M. HAITINGER.

Thioketone, Thioacetale und Aethylensulfide. Von ALEXANDER SCHÖNBERG. Heft 19 in Sammlung chemischer und chemisch-technischer Vorträge. Stuttgart 1933. Verlag Ferdinand Enke. 77 Seiten. Preis RM 6·50.

A. SCHÖNBERG, dem wir eine große Zahl theoretisch wie experimentell sehr interessanter Arbeiten über die Chemie der organischen Schwefelverbindungen ver-

danken, hat die von ihm selbst und von anderen Forschern auf diesem Gebiete erzielten Ergebnisse in der vorliegenden Monographie in sehr übersichtlicher Weise zusammengestellt. Es werden nacheinander Darstellungsweisen, physikalische und chemische Eigenschaften der drei im Titel genannten Körperklassen besprochen, wobei der Verfasser vor allem die Ähnlichkeiten und Abweichungen im Verhalten der entsprechenden Sauerstoffisologen hervorhebt. Besonders Interesse beanspruchen gerade diejenigen Reaktionen der Thioketone, die prinzipiell andersartig verlaufen als bei den entsprechenden Ketonen (z. B. Umsetzungen mit Alkali- und Magnesiumorganischen Verbindungen, mit Diazoverbindungen oder Ketonen); weiters werden bemerkenswerte Parallelen im Verhalten von Thioketonen und Hexaarylathanderivaten aufgezeigt, insbesondere bezüglich der Polymerisationstendenz der beiden Körperklassen. Andere reizvolle Probleme, die sich bei den SCHONBERG'schen Untersuchungen über Thioketone ergaben, sind die Beziehungen, die zwischen Farbe und Reaktionsfähigkeit oder zwischen Wärmebeständigkeit und Konstitution bestehen. Diese wenigen Angaben aus dem Inhalt der vorliegenden Monographie mögen zeigen, daß die Lektüre der mit besonderer Sachkenntnis verfaßten Schrift jedem Chemiker warmstens empfohlen werden kann; die engeren Fachkollegen des Autors werden ihm für die sehr vollständige Literaturübersicht dankbar sein und aus dieser Zusammenstellung manche Anregung für weitere Forschungsarbeiten empfangen. A. BONDI.

Qualitative chemische Analyse nach dem Schwefelnatriumgang. Unter Mitarbeit von Hofrat Prof. Dr. techn. h. c. et phil. GEORG. VORTMANN †. Bearbeitet und herausgegeben von Prof. Ing. ROBERT LIEBER. VIII und 184 Seiten. 8°. Broschiert. RM 7·50, S 12·75, in Leinen gebunden RM 9·—, S 15·30. Verlag Emil Haim & Co., Wien, I.

Der von G. VORTMANN eingeführte Gang der systematischen qualitativen Analyse mit Hilfe von Schwefelnatrium, dem eine andersartige Gruppentrennung als dem klassischen Schwefelwasserstoffgang zugrunde liegt, hat sich in Unterricht und in der Praxis gut bewährt. Der Verfasser des vorliegenden Buches, ein Schüler VORTMANN's, hat sich in dankenswerter Weise der Aufgabe unterzogen, die Beschreibung des Schwefelnatriumganges mit zahlreichen Ergänzungen und Erläuterungen zu versehen, die nicht nur das Prinzip dieses besonderen Analysenganges betreffen, sondern darüber hinaus eine gute Einführung in die qualitative anorganische Analyse darstellen. Das Buch enthält nach sehr klaren Ausführungen über Vorprüfung fester und flüssiger Stoffe sowie Angaben über Auflösen und Aufschluß fester Stoffe auf 36 Seiten den allgemeinen Gang zur Auffindung von Kationen nach VORTMANN. Hierbei ist durch eine sinnfällige Anordnung das rein Rezeptmäßige der erforderlichen Operationen hervorgehoben, so daß danach in gleicher Weise wie nach der bisher üblichen Broschüre des VORTMANN-Ganges (Deuticke, Wien 1929) gearbeitet werden kann. Unmittelbar hinter den zum Analysengang erforderlichen Angaben hat LIEBER in mustergültiger Weise alles Wissenswerte über die Wirksamkeit der verwendeten Reagenzien über die damit bewerkstelligten Umsetzungen, über Fehlerquellen usw. angegeben. Darin liegt ein besonderer Vorzug dieses Buches, weil durch derartige Angaben der nach dem Analysengang Arbeitende dazu verhalten wird,

auch die theoretischen Ergänzungen zu lesen. Ein besonderer Abschnitt (etwa 90 Seiten) ist den Reaktionen der Kationen gewidmet, wobei auch die seltenen Elemente einbezogen werden. Es finden sich daselbst Angaben über bisher weniger gebräuchliche Spezialreaktionen sowie mikrochemische (Tüpfelreaktionen), die sich für Identitätsreaktionen eignen. In analoger Weise wie die Analyse der Kationen hat LIEBER die der Anionen behandelt. Nach einem kurzen Abschnitt über Vorprüfung auf Anionen folgt der allgemeine Gang zur Auffindung derselben (9 Seiten) und hierauf die Angabe von Einzelreaktionen (etwa 20 Seiten). An allen Stellen hat der Verfasser durch zahlreiche Literaturangaben, die auch die neuesten Arbeiten betreffen, eine wertvolle Bereicherung des Buches ermöglicht. Man merkt diesem ausgezeichneten Werke an, mit welcher Liebe, Sorgfalt und Sachkenntnis der Autor den Stoff behandelt hat. Es ist zu wünschen, daß dieses Buch eine weitgehende Verbreitung findet; es wäre von Vorteil, wenn in einer neuen Auflage auch der Schwefelwasserstoffgang Berücksichtigung finden und bei den Prüfungen von Anionen mikrochemische Reaktionen aufgenommen werden könnten. F. FEIGL.

Gesteinsanalytisches Praktikum. Von E. DITTLER. Verlag Walter de Gruyter. Berlin und Leipzig 1933. VIII und 111 Seiten. Preis Lwd. RM 4·—.

Das Buch stellt eine klare und übersichtliche Anleitung zur Ausführung von Gesteinsanalysen dar und eignet sich vor allem als Praktikumsbuch für Studenten der Mineralogie und Chemie. Neben den zünftigen Methoden der Gesteinsanalyse wurden einige neuere Verfahren beschrieben, die der Verfasser auf Grund eigener reicher Erfahrungen bestens empfehlen kann: so die kolorimetrische Manganbestimmung mit Perjodat, die Aluminium-Beryllium-Trennung durch Fällung von Aluminium-oxychinolin, die maßanalytische Borsäurebestimmung nach SCHULEK und VASTAGH und einige mehr. Sehr wertvoll ist auch, daß der Verfasser, wo anhängig, mikrochemische Methoden berücksichtigt.

In einem besonderen Anhang des Buches befindet sich ein von A. KÖHLER verfaßter Abschnitt über Kontrolle und graphische Darstellung der Gesteinsanalysen; es ist eine sehr wertvolle Anleitung, Gesteine auf Grund mikroskopischer und chemisch-analytischer Befunde richtig zu interpretieren.

Das Buch wird zweifellos viele junge Mineralogen zu eingehender Beschäftigung mit der Gesteinsanalyse anregen, die gerade durch die neuen Forschungen V. M. GOLDSCHMIDT's erhöhte Bedeutung für die Mineralogie besitzt. F. FEIGL.

Druckfehlerberichtigung. In der ersten Lieferung des Bandes XIV der MIKROCHEMIE finden sich in der Besprechung des Buches „**Mikrokemi. En översikt över den oorganiska mikroanalysens metoder. Fyra föredrag.** Av HERBERT ALBER" zwei sehr störende Druckfehler. Es soll heißen:

Seite 115, Zeile 13 v. u.: „anorganischen" (statt „organischen");

Seite 116, Zeile 14 v. u.: „Eisenstück" (statt „Tintenstrich").

Der zweite Fehler ist durch eine unrichtige Übersetzung aus dem Deutschen ins Schwedische zustande gekommen.

VARIA.

Prof. Dr. R. Wasicky, Vorstand des pharmakognostischen Instituts der Universität Wien, vollendete am 6. Februar 1934 sein 50. Lebensjahr, welchen Anlaß seine Kollegen, Freunde und Schüler benützten, ihm ihre herzlichsten Glückwünsche zum Ausdruck zu bringen.

Prof. Dr. R. Wasicky in Wien wurde in Anerkennung seiner Verdienste um die Förderung der Kultur von Arzneipflanzen in Österreich das große silberne Ehrenzeichen für Verdienste um die Republik Österreich mit Nachsicht der Taxe verliehen.

Die Österreichische Pharmazeutische Gesellschaft hielt am 20. Oktober d. J. ihre 60. Hauptversammlung ab, bei welcher die Herren Prof. Dr. R. WASICKY, Wien, Prof. Dr. L. KOFLER, Innsbruck, Prof. Dr. A. ZINKE, Graz, wissenschaftliche Vorträge hielten. Zu Ehrenmitgliedern des Vereines wurden Prof. Dr. R. EDER, Zürich, Prof. Dr. L. VAN ITALLIE, Leiden, und Prof. Dr. H. ZÖRNIG, Basel, zum korrespondierenden Mitglied Prof. Dr. R. JARITZKY, Braunschweig, ernannt.

Prof. Dr. W. Böttger ist vertretungsweise mit der Leitung des Physikalisch-chemischen Institutes an der Universität Leipzig beauftragt worden.

Dr. A. Friedrich erhielt die Lehrberechtigung für medizinische Chemie, unter besonderer Berücksichtigung der analytischen Chemie, an der medizinischen Fakultät der Universität Wien.

Dr. Z. Stary, Privatdozent für medizinische Chemie an der deutschen Universität in Prag, wurde zum a. o. Professor ernannt.

Prof. Dr. J. B. Niederl, bisher Assistant Professor, ist mit Beginn des W. S. zum Associate Professor für organische Chemie und organisch-chemische Analyse an der Universität New York, Graduate School und Washington Square College ernannt worden.

Chemikertagungen. Der Verein Deutscher Chemiker wird seine nächste Tagung in Köln vom 23. bis 27. Mai 1934 abhalten. Die nächste Hauptversammlung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft findet voraussichtlich vom 17. bis 19. Mai 1934 in Bonn statt.

mit Petroläther extrahiert, wobei das Neutralfett und das freie Cholesterin in Lösung geht. Durch nachfolgende Extraktion mit Alkohol werden die Cholesterinester herausgelöst. Zur Trennung des Cholesterins vom Neutralfett wird ersteres mit Digitonin abgeschieden. Durch Oxydation der Rückstände der einzelnen Fraktionen und jodometrische Bestimmung des Bichromatüberschusses läßt sich dann die Menge der einzelnen Lipoide bestimmen. Obwohl das Prinzip dieser Methode viel Anklang fand, wurden doch bei der praktischen Anwendung des Verfahrens eine Reihe von Einwänden dagegen erhoben. So weist J. Maas[75] darauf hin, daß infolge der sehr geringen Substanzmengen schon die kleinsten zufälligen organischen Beimengungen naturgemäß einen bedeutenden Einfluß auf das Analysenergebnis auszuüben imstande seien. Schon das Ablösen von Filterfasern könne einen erheblichen Fehler verursachen. Auch sei eine gleichmäßige Leitung der Oxydation mit großen Schwierigkeiten verbunden, aber wegen des empirischen Faktors unbedingt erforderlich. So soll selbst die Form des Gefäßes, in dem die Oxydation vorgenommen wird (Becherglas oder Eprouvette), zu Unterschieden in den Oxydationswerten führen. Das Ablösen von Papierfasern kann nach H. Forster[76] vermieden werden, wenn die Papierblättchen bei der Vorbehandlung mit dem Extraktionsmittel stark geschüttelt werden. H. Heckscher und O. K. Möller[77] bemerken, daß bei Bang's Methode die verwendete Schwefelsäure und das Kaliumbichromat von bestimmter Qualität sein und ständig kontrolliert werden müssen. W. Radsma und W. Pirngadi[78] verwenden das Verfahren von J. Bang mit einigen Abänderungen und halten es für solche Zwecke, bei denen die Genauigkeit nicht zu groß sein braucht, für durchaus brauchbar. H. Gorodinsky[79] bestimmt den Lipoidgehalt im Harn mit einer entsprechenden Modifikation der Bang'schen Methode.

A. v. Szent-Györgyi[80] hat gleichzeitig mit seinem gravimetrischen Verfahren auch ein maßanalytisches bekanntgegeben, welches

[75] Biochem. Ztschr., **144**, 379 (1924).
[76] Biochem. Ztschr., **146**, 562 (1924).
[77] Skand. Arch. f. Physiol., **52**, 222 (1927).
[78] Arch. néerl. Physiol., **14**, 345 (1929).
[79] Biochem. Ztg., **159**, 379 (1925).
[80] Biochem. Ztg., **136**, 112 (1923).

eine Vervollkommnung der Bang'schen Methode darstellt. Verfasser sammelt das in gleicher Weise wie beim gravimetrischen Verfahren gefällte Cholesterindigitonid in einem Filterröhrchen, das mit einem Dampfmantel umgeben ist und oben zu einem Trichterchen erweitert ist. Nachdem der Niederschlag auf dem Filter mit Wasser gewaschen ist, leitet man durch den Mantel Wasserdampf und setzt das Waschen mit Wasser solange fort, bis alles überschüssige Digitonin entfernt ist. Nun wird an Stelle des Absaugkolbens das Filterröhrchen auf einen Titrierkolben aufgesetzt und es werden auf das Filter mit einer genauen Pipette 5 ccm Chromschwefelsäure gebracht. War die Menge ausreichend, so muß das Filter nach dem Absaugen rein weiß erscheinen, sind aber noch gefärbte Reste darauf vorhanden, so werden weitere 5 ccm Chromschwefelsäure zugegeben. Dann wird der Unterdruck aufgehoben, das Filter mit ungefähr 1 ccm Wasser durchgespült und wieder abgesaugt und diese Operation dreimal wiederholt. Dabei sieht man, wie die Farbe des Filtrats im Kolben vom anfänglichen Schmutzigbraun in ein reines Tiefblau übergeht. Man läßt den Kolbeninhalt noch eine Viertelstunde stehen und setzt dann soviele Male 50 cm Wasser zu, als Pipetten Chromschwefelsäure zugesetzt wurden, und titriert in der üblichen Weise jodometrisch mit $\frac{n}{10}$ Natriumthiosulfat. Nach T. Tominaga[81] liefert das Verfahren von Szent-Györgyi etwas zu hohe Werte, weil das Auswaschen des überschüssigen Digitonins nicht vollständig möglich ist. Zur Verbesserung des Verfahrens fällt der Verfasser das Cholesterin in einem Zentrifugenglas und wäscht unter Zentrifugieren nacheinander zweimal mit 80%igem wässerigen Aceton und dann mit reinem Aceton. Zwischen den einzelnen Zentrifugierungen wird das Zentrifugenglas in einem Wasserbad von 40 bis 45° C gehalten. A. Hinrichs und L. Klemm[82] erhalten bei Anwendung der Methode von Szent-Györgyi gute Resultate, doch genügt nach ihrer Meinung ein fünfmaliges Waschen mit Wasser nicht zur restlosen Entfernung des überschüssigen Digitonins. Man kann aber, ohne Verluste befürchten zu müssen, mit 100 bis 150 ccm Wasser waschen. Bezüglich technischer Details machen die Verfasser eine Reihe von Angaben. So soll das Vakuum

[81] Biochem. Ztg., **155**, 119 (1925).
[82] Biochem. Ztschr., **210**, 191 (1929).

langsam hergestellt und wieder aufgehoben werden, da sonst Teilchen des Gummistopfens abgelöst und mitoxydiert werden können. Bei der Oxydation soll das Filterröhrchen nur zur Hälfte mit Chromschwefelsäure gefüllt werden, da sonst durch Kapillarwirkung Teile des Niederschlages nach oben gezogen werden und so der Oxydation entgehen. An Stelle des Asbestfilterröhrchens empfehlen sie die Verwendung eines Glasfiltergerätes. J. TILLMANS, H. RIFFERT und A. KÜHN[83] verwenden das Verfahren von SZENT-GYÖRGYI, das nach ihren Angaben exakte Werte liefert nach den für ihre Zwecke notwendigen Modifikationen zur Bestimmung des Cholesteringehaltes von Teigwaren.

W. R. BLOOR[84] gelingt es, eine Vervollständigung der Oxydation nach dem BANG'schen Verfahren durch Einführung des Silberkatalysators von NICLOUX zu erreichen. (5 g Silbernitrat werden in 25 ccm Wasser gelöst und mit einer Lösung von 5 g Kaliumbichromat in 50 ccm Wasser versetzt. Das ausgefällte Silberchromat wird abzentrifugiert, zweimal mit Wasser gewaschen und in 500 ccm konzentrierter Schwefelsäure gelöst.) Die Oxydation muß in einem Thermostat bei genau 124° C während 15 bis 20 Minuten vor sich gehen. S. KATSURA und T. HATAKEYAMA[85] finden, daß bei dem Verfahren von BLOOR Fettsäuren und Cholesterin nur zu 95% oxydiert werden. Sie erzielen eine vollständige Oxydation, wenn sie bei der Oxydation eine Stunde im siedenden Wasserbad erhitzen. Zur Trennung der Fettsäuren von Cholesterindigitonid extrahieren die Verfasser mit einem Gemisch von Petroläther und Äther (10:1), da nach ihren Erfahrungen Petroläther allein dazu nicht genügt.

Eine Vereinigung der Methoden von SZENT-GYÖRGYI und BLOOR wurde von R. OKEY[86] durchgeführt, der das abgeschiedene Cholesterindigitonid mit Chromschwefelsäure und Silberchromat durch viertelstündiges Erhitzen bei 120 bis 125° C oxydiert. Der Fehler dieser Methode soll bei einer Menge von 0,5 bis 1 mg Cholesterin 0,5 bis 5,4% betragen. Bei der Bestimmung der Cholesterinester macht der Verfasser die Wahrnehmung, daß durch die Verseifung

[83] Ztschr. f. Unters. d. Lebensm., **60**, 361 (1930).

[84] Journ. biol. Chem., **77**, 53 (1928).

[85] Biochem. Ztschr., **234**, 462 (1931).

[86] Proceed. Soc. exper. Biol. u. Med., **26**, 518 (1929), Journ. Biol. Chem., **87**, XXI (1930), und **88**, 367 (1930).

mit konzentrierter Natronlauge und Alkohol nach dem Eindampfen ein Teil des Cholesterins so verändert wird, daß er nicht mehr mit Digitonin reagiert. Wird aber der Alkohol im Stickstoff- oder Kohlensäurestrom entfernt, so läßt sich diese Veränderung des Cholesterins weitgehend vermeiden. Dieselbe Erscheinung findet er auch bei käuflichem Cholesterin, das durch Verseifung dargestellt wurde. M. YASUDA[87] findet bei der Nachprüfung des Verfahrens von R. OKEY, daß dieses nur bei reinen Cholesterinlösungen und halbstündiger Oxydation (gegen 20 Minuten im Original) brauchbare Werte liefert. Bei der Analyse von Gewebsextrakten nach dieser Methode soll das gefällte Cholesterindigitonid stets oxydable Verunreinigungen enthalten, die durch Auswaschen nicht zu entfernen sind. Außerdem erfolgt die Fällung des Digitonids bei Anwesenheit größerer Mengen von anderen Lipoiden nur langsam und unvollständig. Durch Eindampfen des mit der Digitoninlösung versetzten Cholesterinextraktes zur Trockne, Aufnehmen in Wasser und Versetzen mit Aceton soll sich der Niederschlag besser abscheiden und das überschüssige Digitonin in Lösung gehen. M. E. TURNER[88] berichtet über eine Verbesserung der Cholesterinfällung beim Verfahren von OKEY. Er fällt das Cholesterin als Digitonid in einem Zentrifugengläschen und dampft dann die Mischung zur Trockne ein. Beim Aufnehmen in Äther soll sich das Digitonid flockig abscheiden.

Eine neue maßanalytische Cholesterinbestimmung wird von F. RAPPAPORT und R. KLAPHOLZ[89] angegeben, und zwar in dieser ersten Mitteilung für reine Cholesterinlösungen. 1 ccm Cholesterinlösung wird mit 3 ccm 0,1%iger alkoholischer Digitoninlösung in einem graduierten Reagenzglas 5 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen auf Handwärme werden 2 ccm Wasser von 50° C zugesetzt und die Mischung über Nacht kalt aufbewahrt. Nach dieser Zeit füllt man mit Wasser 12 ccm auf und filtriert. 10 ccm des Filtrats werden nach Zusatz von 1 ccm 40%iger Schwefelsäure 2 Stunden im Dampfbad hydrolysiert. Die dabei aus dem überschüssigen Digitonin abgespaltene Hexose wird titri-

[87] Journ. Biol. Chem., **92**, 303 (1931).
[88] Journ. Biol. Chem., **92**, 495 (1931).
[89] Biochem. Ztschr., **258**, 464 (1933).

metrisch bestimmt. In der gleichen Weise werden 3 ccm der verwendeten Digitoninlösung behandelt.

Andere Methoden.

E. HERZFELD[90] berichtet über ein Verdünnungsverfahren auf Grund der LIEBERMANN-BURCHARDT'schen Reaktion und sucht auf diese Weise die beim kolorimetrischen Verfahren auftretenden Störungen durch gefärbte Beimengungen zu vermeiden. 1 ccm Serum wird tropfenweise mit 15 ccm absolutem Alkohol versetzt und die Mischung einige Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Dann wird vom Eiweißniederschlag abfiltriert, der Niederschlag mit Chloroform-Alkohol und reinem Chloroform gewaschen und das Filtrat und die Waschflüssigkeiten in einer Porzellanschale gesammelt und eingedampft. Der Rückstand wird in Chloroform gelöst, davon eine Verdünnungsreihe angelegt und jene Grenzkonzentration bestimmt, bei der nach 10 Minuten nach der LIEBERMANN-Reaktion noch Grünfärbung eintritt. E. BACKLIN[91] bestimmt die bei der Oxydation des Cholesterins nach der Methode von BLOOR gebildete Kohlensäuremenge gasvolumetrisch. Die Oxydation wird in einem Kölbchen vorgenommen und die entwickelte Kohlensäure im Mikroapparat zur Bestimmung der Alkalireserve des Blutes nach D. VAN SLYKE[92] aufgefangen. L. SURANYI und A. KORENYI[93] berichten über eine Cholesterinbestimmungsmethode, die auf den folgenden Untersuchungen beruht: Setzt man zu einer alkoholischen Cholesterinlösung das gleiche Volumen Wasser, so wird das Cholesterin ausgefällt und die Lösung durch suspendiertes Cholesterin getrübt; wird nun wieder Cholesterinlösung zugesetzt, so wird nach Zusatz einer gewissen Menge die Lösung wieder ganz klar. Je nach der Menge des gelösten Cholesterins wird dazu eine mehr oder weniger große Menge Cholesterinlösung nötig sein. Die Autoren bestimmten nun für Cholesterinlösung verschiedenen Gehaltes diese entsprechenden Mengen, so daß aus dem zum Lösen des ausgefällten Cholesterins verbrauchten Volum Cholesterinlösung der Cholesteringehalt derselben in einer Tabelle abgelesen werden kann. Zur

[90] Schweiz. med. Wschr., **58**, 103 (1928).
[91] Biochem. Ztschr., **217**, 482 (1930).
[92] Journ. of biol. Chem., **30**.
[93] Biochem. Ztschr., **160**, 178 (1925).

Bestimmung im Serum wird das Cholesterin nach der Methode von AUTHENRIETH-FUNK (siehe diese) isoliert, das Chloroform verdampft und der Rückstand in der der Blutmenge entsprechenden Menge Alkohol gelöst. 0,1 ccm dieser Lösung wird mit 0,1 ccm Wasser und dann soviel Cholesterinlösung versetzt, bis die Trübung vollständig verschwunden ist. Die Resultate werden mit einer Testlösung in der gleichen Weise kontrolliert. In einer weiteren Mitteilung wird über Verbesserungen des Verfahrens und Anwendung auf die Bestimmung des freien und gebundenen Cholesterins mitgeteilt. Über Methoden zur Bestimmung des Cholesterins im Serum durch Hemmung der Saponinhaemolyse berichten Z. MICHALSKI[94] und N. BELCHOV[95]. Nach letzterem verbindet sich das Cholesterin mit Saponinen in konzentrierter Lösung chemisch nach dem von A. WINDAUS (siehe diesen) aufgestellten Schema, während es in größerer Verdünnung durch Adsorption gebunden wird, wobei auf die Übereinstimmung mit POST[96] hingewiesen wird, der in einem Falle zur Neutralisation von drei Teilen Saponin 40 Teile Cholesterin verbraucht hat. Kolloides Cholesterin bindet größere Saponinmengen als molekular gelöstes. Bei der Neutralisation von Saponin mit Serum erhält man, wenn die Saponinwerte auf der Ordinate und die Cholesterinwerte auf der Abszisse eines Koordinatensystems aufgetragen werden, eine Kurve, die zunächst steil ansteigt und dann in eine Gerade übergeht.

[94] Polska gaz. lekarska, **1**, 653 (1922); nach Ber. ges. Physiol., **15** (1922).
[95] Journ. de physiol. et de pathol. gen., **21**, 334 (1923).
[96] Arch. f. klin. Med., **100**, 259 (1910).